

# NEUE ANTIKÖRPERSELEKTIONSSTRATEGIEN

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Anna Katharina Stanisak  
aus Eutin

1. Referent: Prof. Dr. Stefan Dübel

2. Referent: Prof. Dr. Jürgen Bode

eingereicht am: 12.12.2014

mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.02.2015

Druckjahr 2015

# Zusammenfassung

In Zeiten der aufstrebenden personalisierten Medizin ist die schnelle und zuverlässige Generierung von spezifischen Antikörpern von besonderer Bedeutung - sei es zum Zwecke der Forschung, der Diagnostik oder der Therapie. Auch für die Erforschung der Proteomics, der Gesamtheit aller Proteine eines Organismus, sind spezifische Antikörper unabdingbar. Deren Generierung *in vitro* wird seit den 1990er Jahren durch das Screenen von Antikörper-Phagenbibliotheken im sogenannten Panning erfolgreich durchgeführt. Verschiedene Faktoren wie die Antigenproduktion, die Antigenaufreinigung, der Verbrauch großer Mengen Antikörper-Phagenbibliotheken und der große manuelle Aufwand führen allerdings zu einer Limitierung dieser Methode im Hochdurchsatz. Aus diesem Grund müssen neue Antikörperselektionsstrategien für Hochdurchsatzverfahren entwickelt und deren Realisierung systematisch getestet werden. In dieser Arbeit wurde die etablierte Panningmethode mit scFv-Phagenbibliotheken auf immobilisiertem Antigen auf ihr Potential bezüglich der Miniatürisierung analysiert. Zusätzlich wurde die Protein-Microarraytechnologie in der Arbeitsgruppe etabliert und ihre Limitierung für die Anwendung im Panning aufgezeigt. Als unabhängige Technologie wurde eine Kombination aus Antikörper-Phagenbibliotheken und Antigen-Zelloberflächenbibliotheken entwickelt und das Potential für Antigen-Antikörper-Interaktionsstudien diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnten so wichtige Vorarbeiten geleistet und Trends erfasst werden, die die Vision eines proteomweiten Antikörperrepertoires in Zukunft ermöglichen können.

## Summary

In the era of the upcoming personalized medicine the fast and reliable generation of specific antibodies is of strong interest for research, diagnostics and therapy. Furthermore, for additional investigations on proteomics, the entire set of proteins produced by an organism, antibodies are indispensable, too. The generation of which has successfully been established by *in vitro* panning of antibody phage libraries since the early 1990s. However, various factors such as the production of target antigens, their purification, the need of large amounts of antibody phage libraries, and the laborious process set limits to the method. Thus, new antibody selection strategies for high throughput generation of antibodies need to be developed and evaluated concerning their feasibility. In this study the established panning method with scFv-phage libraries on immobilized antigen was systematically analyzed with regard to its miniaturization scaling potential. In addition, epoxysilane based protein microarrays were established in the research group and their limits for the use in pannings were identified. As an independent technology, combinations of antibody phage display with antigens displayed on *Escherichia coli* surfaces were tested and their potency as high throughput tool in antigen-antibody interaction studies was evaluated. In summary, this study entails important preliminary work and covers trends which allow the realization of a proteome-wide set of antibodies in the future.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>III</b>
<b>Summary</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Antikörper . . . . .	1
1.2 Antikörperklassen . . . . .	1
1.3 Rekombinante Antikörperformate . . . . .	4
1.4 Generierung von Antikörpern . . . . .	6
1.5 Display-Technologien . . . . .	7
1.5.1 Antikörper-Phagendisplay . . . . .	7
1.5.2 Panning mit scFv-Phagenbibliotheken . . . . .	10
1.6 Protein-Microarrays . . . . .	11
1.7 Proteomics . . . . .	13
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>14</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>15</b>
3.1 Material . . . . .	15
3.1.1 Verbrauchsmaterial . . . . .	15
3.1.2 Geräte . . . . .	16

## *Inhaltsverzeichnis*

3.1.3	Chemikalien . . . . .	19
3.1.4	Allgemeine Lösungen . . . . .	20
3.1.5	Nährmedien und Supplemente . . . . .	24
3.1.6	Software . . . . .	26
3.1.7	Kommerzielle Kits . . . . .	27
3.1.8	Chromatographiesäulen . . . . .	28
3.1.9	Enzyme . . . . .	28
3.1.10	Antigene und Antikörper . . . . .	29
3.1.11	Bakterienstämme, Bakteriophagen und Zelllinien . . . . .	30
3.1.12	Vektoren . . . . .	31
3.1.13	Oligonukleotide . . . . .	31
3.2	Methoden . . . . .	34
3.2.1	Mikrobiologische Methoden . . . . .	34
3.2.2	Panning mit scFv-Phagen-Bibliotheken . . . . .	35
3.2.3	Zellbiologische Methoden . . . . .	38
3.2.4	Molekulargenetische Methoden . . . . .	39
3.2.5	Proteinbiochemische und -biophysikalische Methoden . . . . .	42
3.2.6	Protein-Microarrays . . . . .	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1	Panning in Mikrotiterplatten und auf Pin-Mikrotiterplatten . . . . .	48
4.1.1	Selektion von Antikörpern mittels Antikörperphagen-Display . . . . .	49
4.1.2	Screening von monoklonalen scFv-Antikörperfragmenten . . . . .	50
4.1.3	Charakterisierung der Antikörper-Antigen-Bindung in der Immunfärbung . . . . .	51
4.1.4	Produktion und Reinigung von scFv-Fc-Antikörpern . . . . .	52
4.1.5	Auftrennung der scFv-Fc-Antikörper mittels Größenausschlusschromatographie . . . . .	54
4.1.6	Charakterisierung der scFv-Fc-Antikörper in ELISA und Immunfärbung . . . . .	58

## Inhaltsverzeichnis

4.2	Panning auf Microarrays . . . . .	60
4.2.1	Nachweis der Antigenbindung auf Microarrays . . . . .	62
4.2.2	scFv-Phagenbindung auf Microarrays . . . . .	63
4.2.3	Panning auf Microarrays . . . . .	65
4.3	Oberflächenpräsentation von Antigenen auf <i>E. coli</i> . . . . .	67
4.3.1	Konstruktion eines Plasmids für die Oberflächenpräsentation auf <i>E. coli</i> . . . . .	67
4.3.2	Oberflächenpräsentation unter verschiedenen Bedingungen . .	69
4.3.3	Außenmembranisolation . . . . .	72
4.3.4	Anwendung des Oberflächendisplays . . . . .	74
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
5.1	Antikörpergenerierung . . . . .	77
5.2	Antigenproduktion . . . . .	78
5.3	Einfluss der Antigenimmobilisierung auf das Panning . . . . .	79
5.4	Einfluss der Antigenmenge auf das Panning . . . . .	81
5.5	Charakterisierung von Antikörpern . . . . .	83
5.6	Oberflächenpräsentation von Antigenen auf <i>E. coli</i> . . . . .	84
5.7	Alternative Panningstrategien mit oberflächenpräsentierenden Zellen	86
<b>6</b>	<b>Fazit</b>	<b>89</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>103</b>

# Tabellenverzeichnis

3.1	Verbrauchsmaterial . . . . .	15
3.2	Laborgeräte . . . . .	16
3.3	Lösungen und Puffer . . . . .	20
3.4	Nährmedien und Supplemente . . . . .	24
3.5	Software und Datenbanken . . . . .	26
3.6	Kommerzielle Kits . . . . .	27
3.7	Chromatographiesäulen . . . . .	28
3.8	Enzyme . . . . .	28
3.9	Antigene . . . . .	29
3.10	Antikörper . . . . .	29
3.11	Bakterienstämme, Bakteriophagen und Zelllinien . . . . .	30
3.12	Vektoren . . . . .	31
3.13	Oligonukleotide . . . . .	31
3.14	Zusammensetzung der PCR-Ansätze . . . . .	40
3.15	Temperaturprofil präparative PCR . . . . .	40
3.16	Temperaturprofil analytische PCR . . . . .	41
3.17	Zusammensetzung von SDS-Gelen . . . . .	43
3.18	Übersicht der eingesetzten ELISA . . . . .	45
4.1	Auflistung der eingesetzten Antigene . . . . .	49
4.2	Ergebnis des Screening-ELISAs nach der dritten Panningrunde . . . .	50
4.3	Bindung der scFv-Antikörper im Western Blot mit Immunfärbung . .	52
4.4	Ausbeuten der produzierten scFv-Fc-Antikörper . . . . .	54



## Tabellenverzeichnis

4.5	Ergebnisse des Screening-ELISAs für das Panning auf Antigen-Spots	66
4.6	Ansätze zur Wachstums- und Expressionsanalyse . . . . .	69
4.7	Phageninfektion von Antigen-präsentierenden <i>E. coli</i> . . . . .	75

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Isotypen humaner Antikörper (nach [Murphy et al., 2009]) . . . . .	2
1.2	Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers . . . . .	3
1.3	Schematische Darstellung von scFv und scFv-Fc-Antikörpern . . . . .	5
1.4	Schematische Darstellung von Bakteriophage M13 . . . . .	7
1.5	Schematische Darstellung des Phagemids pHAL14 (modifiziert nach [Hust et al., 2011]) . . . . .	9
1.6	Selektion von scFvs mittels Phagendisplay (modifiziert nach [Hust et al., 2011]) . . . . .	11
4.1	Schematische Darstellung der eingesetzten Oberflächen . . . . .	49
4.2	Auftrennung der scFv-Fc-Antikörper per SDS-PAGE . . . . .	53
4.3	Präparative SEC der scFv-Fc-Antikörper . . . . .	57
4.4	Titration-ELISA der scFv-Fc-Antikörper und ihrer Monomerfraktionen . . . . .	59
4.5	Bindung der scFv-Fc-Antikörper auf <i>E. coli</i> Zelllysaten . . . . .	60
4.6	Schematische Darstellung der Protein-Epoxybindung . . . . .	61
4.7	Schematische Darstellung des Spotmusters und Bild des Microarray-Scans . . . . .	62
4.8	Analyse verschiedener Blockingreagenzien für Microarrays . . . . .	64
4.9	Schematische Darstellung der Oberflächenpräsentation (modifiziert nach [Yang et al., 2008]) . . . . .	68
4.10	Genkarten des Transporters OmpU in pUC18 . . . . .	69
4.11	Wachstumskurven von oberflächenpräsentierenden <i>E. coli</i> . . . . .	70

## Abbildungsverzeichnis

4.12 Immunfärbung der Gesamtzelllysate . . . . .	71
4.13 Immunfärbung der Gesamtzelllysate verschiedener Ansätze zur Ober- flächenpräsentation . . . . .	72
4.14 Coomassie-Färbung/Immunfärbung der <i>E. coli</i> -Außenmembranisolate	73
4.15 Infektion oberflächenpräsentierender <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	76

# Abkürzungsverzeichnis

2xYT .....	<i>double yeast-tryptone medium</i>
$\alpha$ .....	anti
$\beta$ -ME .....	beta-Mercaptoethanol
<i>E. coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
A .....	Ampicillin
Abb. ....	Abbildung
AK .....	Antikörper
AKS .....	Experimentkürzel Anna Katharina Stanisak
AP .....	alkalische Phosphatase
APS .....	Amoniumpersulfat
AS .....	Aminosäure
BCIP .....	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp .....	Basenpaare
BSA .....	<i>bovine serum albumine</i>
C <sub>H</sub> .....	konstante Domäne der schweren Kette
C <sub>L</sub> .....	konstante Domäne der leichten Kette
CDR .....	complementary determining region
cfu .....	<i>colony forming units</i>
CIP .....	calf intestine protease
DM .....	Experimentkürzel Doris Meier
DNA .....	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP .....	Desoxyribonucleotidtriphosphat

## Abbildungsverzeichnis

EDTA .....	Ethylendiamintetraacetat
ELISA .....	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EuPA .....	<i>European Proteomics Association</i>
Fab .....	<i>fragment antigen binding</i>
Fc .....	<i>fragment cristallizable</i>
FCS .....	<i>fetal calf serum</i>
FITC .....	Fluoresceinisothiocyanat
FRP .....	Forschungsrahmenprogramm
Fv .....	<i>fragment variable</i>
fw .....	<i>forward</i>
G .....	Glukose
HAL .....	<i>human antibody library</i>
hIgG1 .....	humanes IgG1
HRP .....	<i>horseradish peroxidase</i>
HT .....	Experimentkürzel Holger Thie
Ig .....	Immunglobulin
IPTG .....	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
K .....	Kanamycin
kDa .....	Kilodalton
konj. ....	konjugiert
LPP .....	Lipoprotein
M .....	Marker
M .....	Milchpulver
MCS .....	<i>multiple cloning site</i>
MTP .....	Mikrotiterplatte
NBT .....	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OD .....	optische Dichte
PBS .....	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR .....	<i>polymerase chain reaction</i>

## Abbildungsverzeichnis

PEI .....	Polyethylenimin
PVDF .....	Polyvinylidenfluorid
rev .....	<i>reverse</i>
rpm .....	<i>rotations per minute</i>
scFv .....	single chain fragment variable
SDS-PAGE ....	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC .....	<i>super optimal broth with catabolic repression</i>
spez. ....	spezifisch
T .....	Temperatur
T .....	Tetracyclin
T .....	Tween
TAE .....	Tris-Acetat-EDTA
TEMED .....	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMB .....	Tetramethylbenzidin
UV .....	ultraviolett
v/v .....	<i>volume in volume</i>
V <sub>H</sub> .....	variable Domäne der schweren Kette
V <sub>L</sub> .....	variable Domäne der leichten Kette
w/v .....	weight in volume

# 1 Einleitung

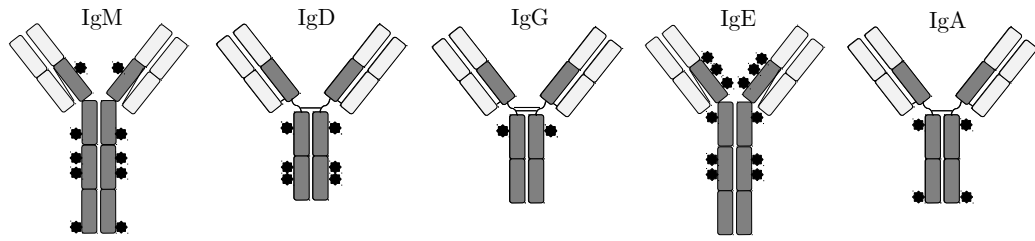
## 1.1 Antikörper

Das Immunsystem schützt den Menschen vor eindringenden Krankheitserregern, sogenannten pathogenen Organismen und Molekülen. Es besteht beim Menschen wie bei allen höheren Wirbeltieren aus der angeborenen und der adaptiven Immunantwort. Während die angeborene Immunantwort wenig spezifisch, genetisch festgelegt und innerhalb von kurzer Zeit aktiv ist, ist die adaptive Immunantwort hoch spezifisch, sehr anpassungsfähig und komplex in der zeitlichen Ausprägung.

Bestandteile der adaptiven Immunantwort sind antigenpräsentierende Zellen, T- und B-Lymphozyten und Antikörper. Die Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, sind von B-Lymphozyten gebildete Glykoproteine, die in Blut oder Lymphe sezerniert werden, dort hoch spezifisch an Pathogene binden und die humorale Immunantwort auslösen. Diese führt zu Neutralisierung oder Opsonisierung des Pathogens, zur Aktivierung des Komplementsystems oder anderen Abwehrmechanismen. Die spezifischen Gedächtniszellen bleiben nach Bekämpfung des Pathogens erhalten, sodass im Falle eines erneuten Kontakts innerhalb kurzer Zeit eine spezifische Reaktion möglich ist [Murphy et al., 2009].

## 1.2 Antikörperklassen

Die Grundstruktur aller Antikörper bestehend aus vier Polypeptidketten ist konserviert. Anhand der sogenannten schweren Ketten werden die fünf Isotypen der



**Abbildung 1.1:** Isotypen humaner Antikörper (nach [Murphy et al., 2009])  
Die humanen Antikörper werden nach ihrer schweren Kette (grau unterlegt) in die fünf Isotypen IgM, IgD, IgG, IgE und IgA eingeteilt. Die schweren Ketten unterscheiden sich in ihren konstanten Domänen, ihren Disulfidbrücken und dem Glykosylierungsmuster.

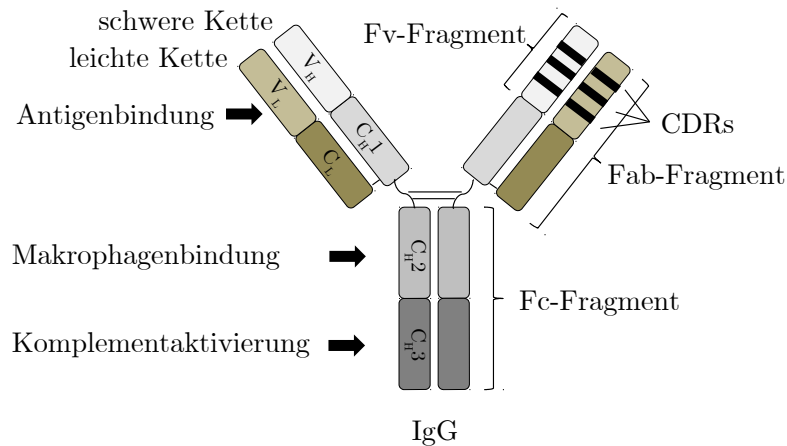
menschlichen Immunglobuline IgA, IgD, IgE, IgG und IgM eingeteilt (siehe Abbildung 1.1), die sich in ihren Disulfidbrücken, Glykosylierungen und konstanten Domänen unterscheiden. Damit vermittelt jeder Isotyp eine bestimmte Immunantwort [Murphy et al., 2009].

Den Hauptbestandteil der Immunglobuline im menschlichen Serum stellt mit ca. 80 % das Immunglobulin G (IgG) [Murphy et al., 2009]. Es handelt sich dabei um ein Antikörpermonomer, das aus jeweils zwei identischen schweren (H, *heavy chain*) und zwei identischen leichten (L, *light chain*) Polypeptidketten besteht. Diese sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden, sodass ein Molekül mit einer molekularen Gesamtmasse von ca. 150 kDa entsteht. Dabei besitzt jede schwere Kette eine molekulare Masse von ca. 50 kDa und jede leichte von ca. 25 kDa. Die schweren Ketten bestehen aus einer N-terminalen variablen Region  $V_H$ , an die sich die konstante Domäne  $C_{H1}$  anschließt (siehe Abbildung 1.2). Diese ist über die sogenannte Hinge-Region durch Disulfidbrücken und starke hydrophobe Wechselwirkungen mit den konstanten Domänen  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  verknüpft. Die leichten Ketten bestehen lediglich aus einer N-terminalen variablen Domäne ( $V_L$ ) und einer C-terminalen konstanten Domäne ( $C_L$ ).



## 1 Einleitung

Neben der Einteilung in Domänen wird ein IgG durch drei Fragmente beschrieben (siehe Abbildung 1.2): das Fv-Fragment (*fragment variable*), das Fab-Fragment (*fragment antigen binding*) und das Fc-Fragment (*fragment crystallisable*). Das Fv-Fragment besteht aus den variablen Domänen der leichten ( $V_L$ ) und der schweren ( $V_H$ ) Kette und ist für die Antigenbindung verantwortlich. Die Spezifität des Antikörpers wird von drei hypervariablen Domänen je Kette bestimmt (*complementary determining regions*, CDRs). Sie sind jeweils 3-20 Aminosäuren lang und werden von den weniger variablen  $\beta$ -Faltblattstrukturen der Gerüstregionen (*framework regions*) eingerahmt. Diese stabilisieren die CDRs und sind ebenfalls an der spezifischen Antigenbindung beteiligt. Das Fab-Fragment besteht neben dem Fv-Fragment aus der konstanten Domäne der leichten Kette und der  $C_H1$ -Domäne der schweren Kette. Das Fc-Fragment vermittelt die Effektorfunktion des Immunglobulins, indem es beispielsweise die Bindung von Makrophagen an den Antikörper ermöglicht oder das Komplementsystem aktiviert [Murphy et al., 2009].



**Abbildung 1.2:** Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers

$V_L$  und  $V_H$ : variable Domänen der leichten und schweren Kette,  $C_L$  und  $C_H$ : konstante Domänen der leichten und schweren Kette, Fv-Fragment: *fragment variable*, Bereich der Antigenbindung, Fab-Fragment: *fragment antigen binding*, Fc-Fragment: *fragment crystallisable*, Bereich mit Effektorfunktion, CDR: *complementary determining region*, komplementaritäts-bestimmende Bereiche.

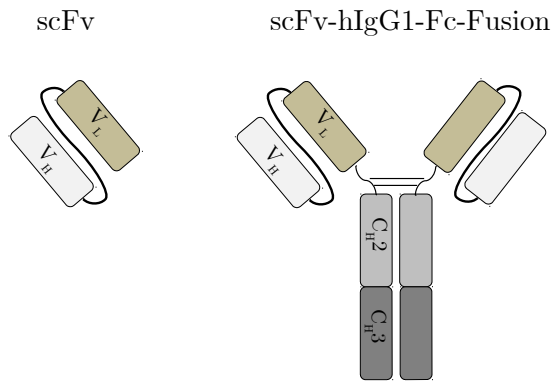
### 1.3 Rekombinante Antikörperformate

Je nach Anwendungsziel können anstatt kompletten Antikörpern auch nur Antikörperfragmente eingesetzt werden. Während Fab'-2- und Fab-Fragmente durch enzymatischen Verdau von IgGs gewonnen werden können, ist die Herstellung der meisten Antikörperfragmente nur rekombinant und mithilfe gentechnischer Methoden möglich [Murphy et al., 2009]. Dabei können diese zum Beispiel mit unterschiedlich flexiblen Linkern verbunden, mit anderen Proteinen oder Toxinen fusioniert oder für eine anschließende Reinigung mit *tags* versehen werden.

Eines der kleinstmöglichen und am häufigsten genutzten Antikörperformate ist der scFv (*single chain fragment variable*). Dabei handelt es sich um ein Fv-Fragment, bei dem die variablen Domänen der schweren ( $V_H$ ) und leichten Kette ( $V_L$ ) über einen flexiblen, 15-20 Aminosäuren langen Peptidlinker miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 1.3) [Huston et al., 1993, Freund et al., 1993, Bird et al., 1988]. Damit ist die notwendige Information zur Antigenbindung auf ein Minimum reduziert [Chaudhary et al., 1989]. Obwohl beide Orientierungen der variablen Domänen ( $V_H$ -Linker- $V_L$  oder  $V_L$ -Linker- $V_H$ ) für die Konstruktion von scFvs möglich sind, gibt es keine allgemeine Regel, welche in Bezug auf Expression und Affinität besser ist [Breitling & Dübel, 1997].

Für viele Anwendungen eignen sich die scFvs aufgrund ihrer geringen Größe. Im Vergleich zu kompletten IgGs weisen sie eine verbesserte Penetration von soliden Tumoren auf [Yokota et al., 1992]. Zudem haben scFvs eine stark reduzierte Serumhalbwertszeit, da sie aufgrund ihres geringen molekularen Gewichts schneller über die Nieren ausgeschieden werden (*renal clearance*) [Colcher et al., 1998, Huston et al., 1993]. Das scFv-Format kann auch für verschiedene Anwendungen von Vorteil sein, bei denen die Effektorfunktion eines Antikörpers für die Anwendung nicht erforderlich oder sogar störend ist [Kipriyanov, 2001].

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung von scFv und scFv-Fc-Antikörpern  
Fv-Fragmente von Antikörpern können über flexible Peptid-Linker zu *single chain* (sc)-Fv-Fragmenten verbunden werden. Durch die Fusion mit C<sub>H</sub>2 und C<sub>H</sub>3 können IgG-ähnliche scFv-Fc-Fusionen generiert werden, die die scFvs um eine Effektorfunktion erweitern.

Ein weiterer Vorteil bei der Herstellung von scFvs ist die Möglichkeit, sie in Prokaryoten, meist in Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* [Dueñas et al., 1994, Chaudhary et al., 1989] zu produzieren. Neben der kostengünstigen Kultivierung der bakteriellen Wirtszellen sind hohe Produktausbeuten durch periplasmatische Expression zu erreichen [Plückthun, 1991, Miethe et al., 2013]. Antikörperfragmente können zudem mit Radionukleotiden, Zytokinen, Wirkstoffen oder Enzymen fusioniert [Sharkey & Goldenberg, 2006, Teicher & Chari, 2011] oder zu bi- oder multivalenten, hochaffinen Fusionen mit optimierten pharmakokinetischen Eigenschaften erweitert werden. Dadurch entstehen weitere Anwendungsmöglichkeiten in Forschung, Diagnostik und Therapie [Dübel et al., 2004]. So kann ein scFv über die Hinge-Region mit einem Fc-Teil fusioniert werden, wenn es um eine Effektorfunktion erweitert werden soll (siehe Abbildung 1.3). Dabei entsteht ein bivalenter, IgG-ähnlicher scFv-Fc Antikörper, dessen Produktion wegen der hohen Komplexität und der posttranslationalen Modifikationen effizient nicht in prokaryotischen, sondern nur in eukaryotischen Zellen stattfinden kann [Schirrmann et al., 2008, Owens & Young, 1994].

## 1.4 Generierung von Antikörpern

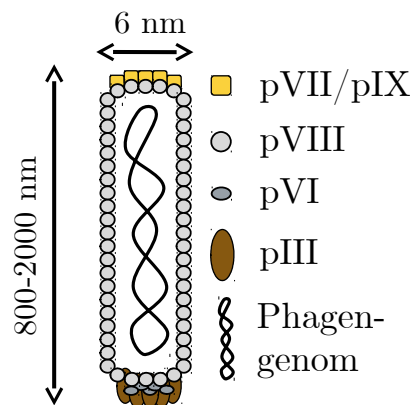
Grundsätzlich werden polyklonale und monoklonale Antikörperpräparationen unterschieden, wobei polyklonale Antikörper auf mehreren B-Lymphozyten basieren und monoklonale Antikörper auf einen Klon zurückzuführen sind. Polyklonale Antikörper werden seit mehr als 120 Jahren durch Immunisierung von Tieren gewonnen und gezielt in der Behandlung von Infektionskrankheiten eingesetzt [von Behring & Kitasato, 1890]. Dabei sind die gewonnenen Seren stark chargenabhängig und nicht definierbar, da das Immunsystem eines jeden Lebewesens andere Immunreaktionen zeigt.

Ein wesentlicher Schritt für die Arbeit mit Antikörpern war die Entwicklung der Hybridomtechnik in den 1970ern. Damit entstand die Möglichkeit, monoklonale Antikörper zu gewinnen [Köhler & Milstein, 1975]. Die Antikörper-produzierenden Milzzellen werden dabei *in vitro* mit immortalen Myelomzellen fusioniert, die dann unter kontrollierten Bedingungen monoklonale Antikörperchargen produzieren. Heutzutage können durch den Einsatz transgener Mäuse mithilfe der Hybridomtechnik sogar humane Antikörper hergestellt werden [Jakobovits, 1995], doch spielen bei dieser Methode ethische Bedenken stets eine Rolle. Außerdem stößt die Methode spätestens dann an ihre Grenzen, wenn toxische oder in der Phylogenetik konservierte Substanzen zur Immunisierung eingesetzt werden sollen [Winter & Milstein, 1991]. Diese methodisch und zeitlich aufwendige Methode wurde Mitte der 1980er Jahre durch die Arbeiten von Smith [Smith, 1985] um die Phagendisplaytechnologie ergänzt, womit es möglich wurde, monoklonale Antikörper *in vitro* aus einem humanen Genrepertoire zu generieren [Owens & Young, 1994, Breitling & Dübel, 1997, Frenzel et al., 2014, Deantonio et al., 2014].

## 1.5 Display-Technologien

### 1.5.1 Antikörper-Phagendisplay

Bakteriophagen sind Viren, die ausschließlich Bakterien infizieren. Der Bakteriophage M13 ist wirtsspezifisch für F-Pilus tragende *E. coli*-Zellen und tötet diese im Gegensatz zu lytischen Phagen nicht ab, sondern vermindert nur ihre Wachstumsrate um ca. 50 % [Barbas et al., 2001]. Dabei werden pro Zellzyklus ca. 200 Phagenpartikel freigesetzt. Das Phagengenom ist einzelsträngige zirkuläre DNA von etwa 6,5 kb und besteht aus 11 Genen: 3 für die Replikation, 3 für die Verpackung des Phagen und 5 für Hüllproteine (pIII, pVI–pIX). Es ist verpackt in einer ca. 800–2000 nm langen und ca. 6 nm breiten tubulären Struktur [Marvin, 1998] aus dem Haupthüllprotein pVIII mit ca. 2700 Kopien. Die Infektion von *E. coli*-Zellen durch M13-Phagen ist ein mehrstufiger Prozess, der durch das pIII des Phagen, den bakteriellen F-Pilus und die *E. coli*-Membranproteine TolQRA vermittelt wird [Russell et al., 1988, Karlsson et al., 2003]. Eine schematische Darstellung des Bakteriophagen M13 ist in Abbildung 1.4 gezeigt.



M13 Bakteriophage

**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung von Bakteriophage M13

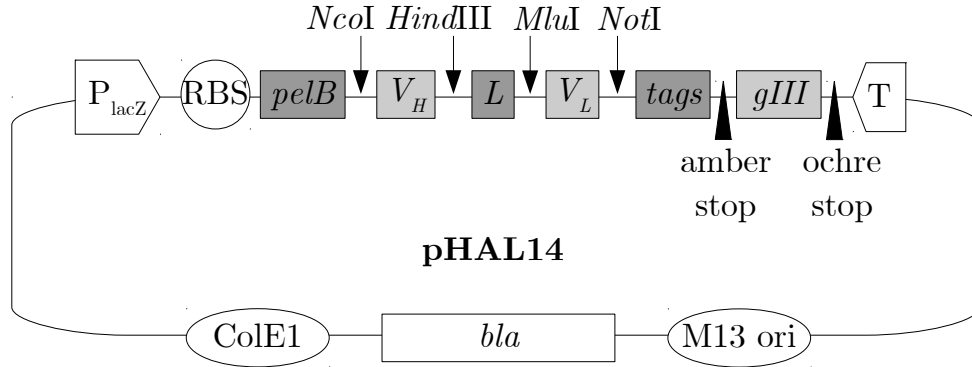
Protein pVIII bildet den Hauptbestandteil der Phagenhülle. Die anderen Proteine liegen in drei- bis fünffacher Kopie vor. Das Phagen-genom besteht aus zirkulärer, einzelsträngiger DNA, hat eine Größe von etwa 6,5 kb und kodiert für insgesamt 11 Gene.

## 1 Einleitung

Die Funktionalität des Phagen-Displays in der Antikörpergenerierung beruht auf der Verbindung von Geno- und Phänotyp [Smith, 1985]. Dafür werden scFv-Gene N-terminal an das Gen des Bakteriophagen-M13-Hüllproteins pIII fusioniert, sodass sie als Fusionsprotein auf der Oberfläche des Phagen präsentiert werden [McCafferty et al., 1990, Barbas et al., 1991]. Die Fusion wird entweder direkt im Phagengenom [McCafferty et al., 1990] oder auf einem separaten Phagendisplay-Plasmid, dem sogenannten Phagemid, generiert.

Phagemide enthalten neben den für die Replikation und Selektion in *E. coli* notwendigen Elementen auch ein Signalpeptid für die Sekretion des Antikörperfragments in das Periplasma, um die korrekte Faltung unter nicht-reduzierenden Bedingungen zu gewährleisten [Skerra & Plückthun, 1988]. Das Phagemid wird nach der Infektion einer *E. coli*-Zelle autonom repliziert und anschließend durch einen Helferphagen in Phagenpartikeln verpackt [Barbas et al., 1991, Vieira & Messing, 1987]. Der Helferphage M13K07 trägt eine Mutation im Replikationsursprung des Genoms, wodurch das Phagemid bevorzugt verpackt wird [Vieira & Messing, 1987].

Während die Verpackung mit M13K07 lediglich in 1–10% der Phagen zu einem Display der scFvs führt, erzielt der sogenannte Hyperphage ein polyvalentes Display, da in diesem Helferphagen die genetische Information für das Wildtyp-pIII deletiert ist [Rondot et al., 2001]. Bei der Infektion spezieller Suppressorstämme ist es zudem möglich, durch ein *amber stop codon* zwischen scFv-Gen und gIII sowohl scFv-pIII-Fusionen für den Einbau in Phagen, als auch lösliche scFvs zu produzieren. Die Expression ist dabei durch einen induzierbaren Promotor ( $P_{lacZ}$ ) steuerbar [Breitling & Dübel, 1997]. Die Genkarte des in dieser Arbeit verwendeten Phagemids pHAL14 ist in Abbildung 1.5 dargestellt.



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung des Phagemids pHAL14 (modifiziert nach [Hust et al., 2011])

Das scFv-pIII-Fusionsprotein ist auf dem Phagemid pHAL14 kodiert.  $P_{lacZ}$  : induzierbarer lacZ-Promotor; RBS: Ribosomen-Bindungsstelle; *pelB*: Gen des Signalpeptids;  $V_H$ : Gen der schweren Kette des scFv;  $V_L$ : Gen der leichten Kette des scFv; *tags*: für die Reinigung und Detektion des scFv-Fragments; *amber stop*: UAG; *ochre stop*: UAA; *gIII*: Gen des Phagen-Hüllproteins pIII; ColE1: Replikationsursprung für *E. coli*; M13 ori: Signal für die Phagen-Verpackung; *bla*:  $\beta$ -Lactamase-Gen als Selektionsmarker; *NcoI/HindIII/MluI/NotI*: Klonierungsstellen.

Die scFv-Phagenbibliotheken können eine theoretische Diversität von  $10^{11}$  erreichen [Sblattero & Bradbury, 2000] und werden nach dem Ursprung der präsentierten Antikörperfragmente in Immunbibliotheken [Clackson et al., 1991], naive [de Haard et al., 1999], semi-synthetische [Pini et al., 1998] und synthetische Bibliotheken [Hayashi et al., 1994] unterteilt. Zur Zeit befinden sich mehrere aus Phagenbibliotheken generierte therapeutische Antikörper in der klinischen Entwicklung [Osbourn et al., 2005, Dübel, 2007].

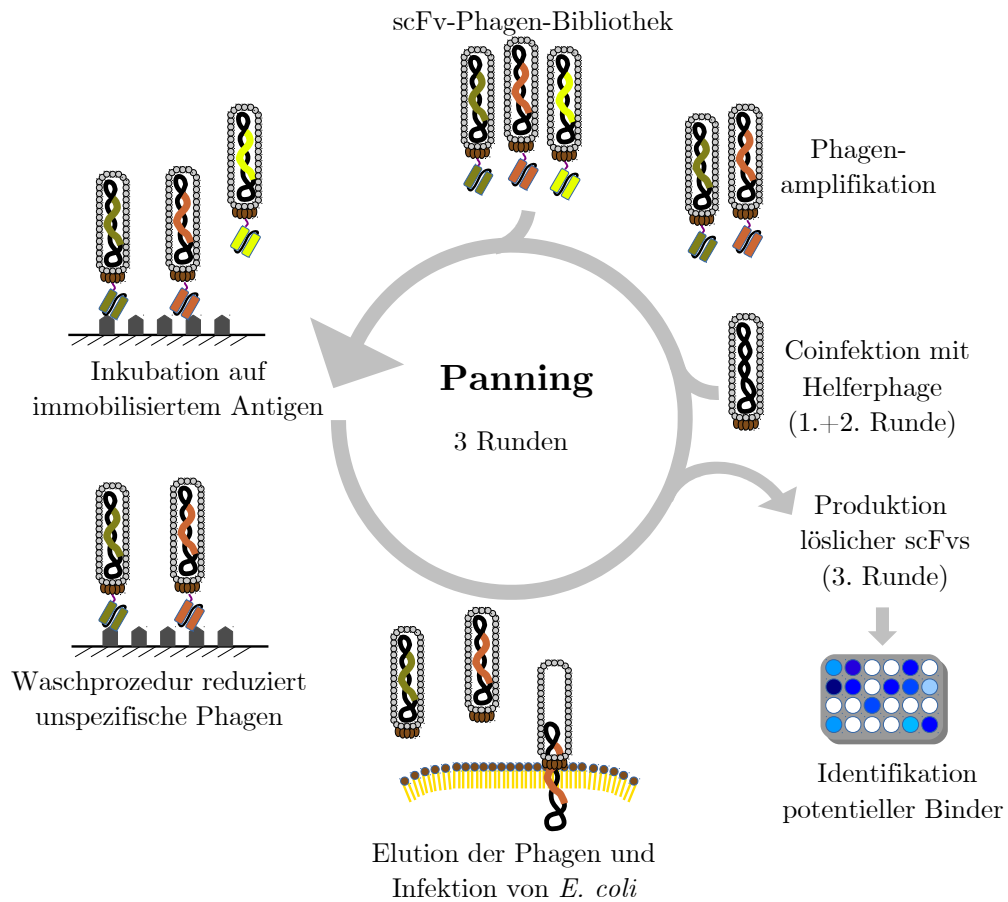
### 1.5.2 Panning mit scFv-Phagenbibliotheken

Aus scFv-Phagenbibliotheken können spezifische Antikörperfragmente im sogenannten „Panning“ selektiert werden [Parmley & Smith, 1988]. Dafür wird das Antigen auf einer Oberfläche immobilisiert und anschließend mit der scFv-Phagenbibliothek inkubiert. Durch gründliches Waschen werden ungebundene oder schwach gebundene scFv-Phagen entfernt, sodass die Zahl unspezifischer scFv-Phagen reduziert wird. Die verbliebenen Phagen werden von dem immobilisierten Antigen eluiert. Dies kann sowohl durch Verschiebung des pH-Wertes, durch eine Erhöhung der Salzkonzentration oder enzymatisch mit Trypsin erfolgen. Bakteriophagen selbst sind gegenüber Trypsinverdau resistent [Breitling & Dübel, 1997], sodass ausschließlich der scFv an einer Trypsinbindestelle vom pIII abgetrennt wird.

Mit den eluierten Phagen werden *E. coli*-Zellen infiziert und durch die anschließende Infektion mit Helferphagen neue scFv-Phagen produziert. Diese werden für die nächste Selektionsrunde eingesetzt, sodass im Laufe von zwei bis vier Panning-Runden spezifische scFv-Phagen angereichert und unspezifische immer mehr dezimiert werden. Zum Screening von potentiellen Bindern werden Klone der letzten Panningrunde vereinzelt, die scFvs löslich in *E. coli* produziert und im monoklonalen ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) auf ihre Wechselwirkung mit dem Antigen getestet [Frenzel et al., 2014]. Eine Übersicht des Pannings ist in Abbildung 1.6 dargestellt.



## 1 Einleitung



**Abbildung 1.6:** Selektion von scFvs mittels Phagendisplay (modifiziert nach [Hust et al., 2011])

Die scFv-Phagenbibliothek wird mit dem immobilisierten Antigen inkubiert. Nach Entfernung unspezifisch gebundener Phagen durch Waschen werden die scFv-Phagen eluiert und durch Reinfektion von *E. coli* und Coinfektion mit Helferphagen amplifiziert und für die nächste Panningrunde eingesetzt. Nach der dritten Panningrunde erfolgt die Identifikation potentieller Binder nach Produktion von löslichen scFvs im Screening-ELISA.

## 1.6 Protein-Microarrays

Die Idee des Protein-Microarrays wurde bereits 1983 vorgestellt [Chang, 1983] und entstand in Anlehnung an den DNA-Microarray, bei dem definierte Gensequenzen gespottet und in der Genexpressionsanalyse zum Beispiel für die Bestimmung von Tumormarkern [Koga et al., 2014], Autoimmunerkrankungen [Moser et al., 2004], und Infektionskrankheiten [Donatin & Drancourt, 2012] genutzt werden.

## 1 Einleitung

Beim Protein-Microarray werden Proteine als mikroskopisch kleine Tropfen (*spots*) auf einem Trägerchip aus Glas oder Kunststoff in genauer Anordnung einer dichten Matrix immobilisiert. Dabei können Spotdichten von über 23.000 Spots/Array erreicht werden [Diehnelt et al., 2010], sodass Protein-Microarrays ein vielversprechendes proteomisches Werkzeug zur Analyse der Wechselwirkungen zwischen Proteinen im Hochdurchsatz sind.

Besonders hilfreich ist die Anwendung auch zur parallelen Analyse der Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen eine Vielzahl von Antigenen [Predki et al., 2005]. Die häufigste Anwendung ist vergleichbar mit einem ELISA im verkleinerten Format, wobei die Vorteile der Miniaturisierung und Automatisierung mit der Verringerung des Antikörper- und Reagenzienbedarfs und des Nachweises niedrigster Konzentrationen von Biomarkern einhergehen [Haab et al., 2001]. Die Auswertung muss dafür ein hohes Signal-Hintergrund-Verhältnis sicherstellen und basiert meist auf Fluoreszenzmarkierung, die sehr sensitiv und kompatibel mit den DNA-Microarray-Auslesegeräten ist. De Wildt et al. haben den Protein-Microarray im Jahr 2000 auch als neue Technik für das Hochdurchsatzscreening von rekombinanten Antikörpern publiziert [de Wildt et al., 2000] und damit einen wichtigen Schritt für die Proteomforschung geleistet, da die Analyse von Kreuzreaktivität, Spezifität und auch das Epitopmapping in bisher nicht erreichten Durchsätzen möglich wurde.

Bei der Herstellung und Nutzung von Protein-Microarrays müssen besonders zwei Parameter beachtet werden. Zum einen dürfen Oberfläche und Immobilisierungsmethode nicht die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine und damit ihre biologische Aktivität verändern, zum anderen sind Proteine sehr empfindlich gegen Umwelteinflüsse. Diese Herausforderungen treffen nicht für DNA-Microarrays zu, da DNA hochstabil und im Vergleich zur Variabilität von Proteinen strukturell extrem konserviert ist. Protein-Microarrays werden aus diesem Grund häufig mit zellfreien Proteinexpressionssystemen direkt auf der Arrayoberfläche synthetisiert, Beispiele

dafür sind PISA (*protein in situ array*)[He & Taussig, 2001], DAPA (*DNA array to protein array*)[He et al., 2008] und NAPPA (*nucleic acid programmable protein array*)[Miersch & LaBaer, 2011].

### 1.7 Proteomics

Das menschliche Genom, die Gesamtheit aller Gene, ist vollständig sequenziert [Levy et al., 2007, Wheeler et al., 2008]. Es kodiert für 20.000–25.000 Proteine. Durch alternatives mRNA-Splicing und posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Ubiquitylierung ist die Gesamtzahl humaner Proteine allerdings vermutlich um ein Mehrfaches größer [Harrison et al., 2002]. Darüber hinaus ist das Proteom eines Organismus nicht statisch wie das Genom, sondern ändert sich entsprechend des Zellzyklus und der Umgebungsparameter. Für die Bestimmung von Lokalisierung und Funktion der Proteine, also die Entschlüsselung des humanen Proteoms, sind Antikörper unabdingbar. Aus diesem Grund wurden zahlreiche Vereinigungen gegründet, die sich der Erforschung und Koordination im Bereich der Proteomics widmen. Ein Beispiel ist die *European Proteomics Association* (EuPA), die seit 2005 die Aktivitäten von 19 nationalen Proteomics-Verbänden koordiniert. Auch im Forschungsrahmenprogramm (FRP) der Europäischen Kommission ist die Proteomforschung durch Projekte wie Affinomics, AffinityProteome und ProteomeBinders festgeschrieben [Europäische Kommission, 2010].

## 2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Weiterentwicklung des Pannings mit scFv-Phagenbibliotheken, um die Selektion von spezifischen Antikörpern im Hochdurchsatzverfahren zu ermöglichen. Dafür soll zunächst auf Grundlage der etablierten Panningmethode das Potential bezüglich der Miniaturisierung experimentell bestimmt werden. Als neue Methode soll das Panning auf Microarrays hinsichtlich der Antigenbindungseigenschaften und der technischen Realisierbarkeit untersucht werden. Nach der eingehenden Charakterisierung der dabei generierten Antikörper bezüglich Sensitivität und Spezifität sollen diese für die Entwicklung und Etablierung eines Systems eingesetzt werden, bei dem Antigene auf der Oberfläche von *Escherichia coli*-Zellen präsentiert werden, um Alternativen zu Antigenproduktion, Antigenreinigung und Immobilisierung aufzuzeigen .

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 3.1:** Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
24-deepwell Mikrotiterplatte Polypropylen, Rundboden	Corning, New York (USA)
96-Well Mikrotiterplatte Costar	Corning, New York (USA)
96-Well Mikrotiterplatte Polypropylen, Rundboden	Greiner Bio-one, Frickenhausen
96-Well Mikrotiterplatte Streptavidin	Nunc, Wiesbaden
Combitips plus (1–50 mL)	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben (Einweg)	Corning, New York (USA)
Filter Minisart 0,2 / 0,45 µm	Sartorius Stedim Biotech, Melsungen
Filter Prefilter Glasfibre	Sartorius Stedim Biotech, Melsungen
Filterpapier (3 mm)	BioRad, Hercules (USA)
Halbmikroküvetten 1,5 mL	Brand, Wertheim
Impfösen (Einweg), steril	VWR, Darmstadt
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Klebefolien, luftdurchlässig	Excel Scientific, Wrightwood (USA)
Klebefolien, nicht luftdurchlässig	Excel Scientific, Wrightwood (USA)

**Tabelle 3.1:** Verbrauchsmaterial (fortgesetzt)

Material	Hersteller
Mikro-Schraubröhrchen 2 mL PP	Sarstedt, Nümbrecht
Nexterion SlideE Objektträger	Schott, Tempe (USA)
Replikator MaxiSorp Nunc-TSP	VWR, Darmstadt
Parafilm	American National Can, Chicago (USA)
PCR-Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen 20 cm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Petrischalen 9 cm	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pin-Mikrotiterplatte Immuno-TSP	Nunc, Wiesbaden
Pipetten (Einweg) 2-25 mL	Corning, New York (USA)
Pipettenspitzen (mit Filter)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (ohne Filter)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
PVDF-Membran T830.1	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäß 1,5 / 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 15 mL / 50 mL	Corning, New York (USA)
Spatel (Einweg), steril	VWR, Darmstadt
Spritzen Braun Injekt 1-20 mL	B. Braun, Melsungen

### 3.1.2 Geräte

**Tabelle 3.2:** Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blot-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Chromatographieranlage	Äkta purifier	GE Healthcare, München
	Profinia Purification	GE Healthcare, München

**Tabelle 3.2:** Laborgeräte (fortgesetzt)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Deepwell-Schüttler	Vortemp 56	Labnet, Woodbridge (USA)
Elektrophorese-Apparaturen	Mini Protean II	Bio-Rad, München
	PerfectBlue Gelsystem	Peqlab, Erlangen
ELISA-Reader	Sunrise	Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer	Columbus Plus	Tecan, Crailsheim
	HydroSpeed	Tecan, Crailsheim
Exsikkator	SICCO Star	Bohlender, Grünsfeld
Filtrationssystem	Nalgen	ThermoFisherScientific, Offenbach
Geldokumentation	Gel Jet Imager	Intas, Göttingen
Blotinkubator	SNAPi.d.	Merck, Darmstadt
Inkubatoren	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
	Certomat BS-1	Braun, Melsungen
	Minitron	Infors HT, Bottmingen (Schweiz)
	Multitron (unbegast/CO2-begast)	Infors HT, Bottmingen (Schweiz)
	Typ BE400	Memmert, Schwabach
Lichtmikroskop	Leitz Diavert	Leitz, Wetzlar
Microarray-Handspotter	MicroCaster	GE Healthcare, München
Microarray-Scanner	GenePix 4100A	Molecular Devices, Sunnyvale (USA)
Netzgeräte	EPS 301/601	GE Healthcare, München
PCR-Gerät	Thermocycler DNA-Engine	BioRad, Hercules (USA)

**Tabelle 3.2:** Laborgeräte (fortgesetzt)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
PCR-Gerät	Thermocycler C1000	BioRad, Hercules (USA)
pH-Meter	CG810	Schott, Mainz
Photometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
	WPA CO8000	Biochrom Ltd, Cambridge (Großbritannien)
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
	Biohit e1200	Biohit, Helsinki (Finnland)
Pipettierhilfe	Accu-jet	Brand, Wertheim
Reinstwasseranlage	Arium 611	Sartorius, Göttingen
Rotoren	SS34	ThermoFisherScientific, Offenbach
	F9S	FIBERLite, Santa Clara (USA)
	F12S	FIBERLite, Santa Clara (USA)
	F21	FIBERLite, Santa Clara (USA)
Sterilwerkbänke	MSC-Advantage	ThermoFisherScientific, Offenbach
	HERAsafe	ThermoFisherScientific, Offenbach
	LaminAir HLB 2472	Heraeus, Braunschweig
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Thermocycler	PTC-200	MJ Research, Waltham (USA)
Waagen	Laboratory LC 6200 D	Sartorius, Göttingen
	E 1200 S	Sartorius, Göttingen



**Tabelle 3.2:** Laborgeräte (fortgesetzt)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Waagen	A 120 S	Sartorius, Göttingen
Wippe	GLF 3013	Omnilab, Bremen
Zentrifugen	5415 D	Eppendorf, Hamburg
	5810 R	Eppendorf, Hamburg
	Heraeus Multifuge 3 S–R	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
	Sorvall RC5B Plus	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
	Sorvall RC6 Plus	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
	Sprout	Heathrow Scientific, Illinois (USA)
	Biofuge fresco	Heraeus, Braunschweig

### 3.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad p.a. und wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), GE Healthcare (München), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Riedel-de Häen (Sarstedt), Roche (Mannheim), Fluka/Sigma-Aldrich (Neu- Ulm) und Serva (Heidelberg) bezogen.

### 3.1.4 Allgemeine Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit vollentsalztem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Sartorius, Göttingen) hergestellt.

**Tabelle 3.3:** Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
<b>Allgemeine Lösungen</b>		
Glycerin	Glycerin, steril	80 % (v/v)
PBS pH 7,4	Natriumchlorid	137 mM
	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	8,1 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	1,8 mM
PBST	Tween 20	0,05 % (v/v)
	PBS	1x
<b>Affinitätschromatographie (Profinia)</b>		
5xBinde- / Entsalzungs- puffer pH 7,0	Natriumchlorid	685 mM
	Kaliumchlorid	13,5 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	21,5 mM
	Natriumdihydrogenphosphat	40,5 mM
5xElutionspuffer pH 3,0	Natriumcitrat	500 mM
2xReinigungslösung pH 8,0	Natriumchlorid	1 M
	Tris	100 mM
4xReinigungslösung pH 4,5	Natriumchlorid	2 M
	Natriumacetat	400 mM
2xLagerungslösung (Entsalzungssäule)	Benzylalkohol	4 % (v/v)
1xLagerungslösung (Protein-A Säule)	Ethanol	20 % (v/v)

**Tabelle 3.3:** Lösungen und Puffer (fortgesetzt)

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
<b>Agarose-Gelelektrophorese</b>		
Agarose		0,7-2 % (w/v)
DNA-Massenstandard	GeneRuler 1kB Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromidlösung		25 mM
Ladepuffer	Fermentas	6x
Laufpuffer TAE pH 8,0	Tris HCl	4 mM
	Essigsäure	2 mM
	EDTA	1 mM
<b>Coomassiefärbung von SDS-Gelen</b>		
Entfärbelösung	Essigsäure	10 % (v/v)
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue GLR-250	0,05 % (w/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Isopropanol	25 % (v/v)
<b>ELISA</b>		
Blocklösung	Milchpulver	2 % (w/v)
	PBST	1x
BSA	BSA (Serva)	2 % (w/v)
Substratlösung (TMB)	Lösung A	95 % (v/v)
	Lösung B	5 % (v/v)
Lösung A pH 4,1	Kaliumcitrat-Monohydrat	30 mM
	Zitronensäure	50 mM
Lösung B	TMB	1 mM
	Aceton	10 % (v/v)
	Ethanol	90 % (v/v)
	Wasserstoffperoxid	0,3 % (v/v)

**Tabelle 3.3:** Lösungen und Puffer (fortgesetzt)

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Stopplösung	Schwefelsäure	1 N
<b>Größenausschlusschromatographie</b>		
Laufpuffer	PBS	1x
Lagerungspuffer	Ethanol	20 % (v/v)
<b>Immunfärbung</b>		
BCIP-Lösung	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	1,5 % (w/v)
	Dimethylformamid	100 % (v/v)
Blocklösung	Milchpulver	2 % (w/v)
	PBST	1x
NBT-Lösung	Dimethylformamid	70 % (w/v)
	NBT	3,0 % (w/v)
Substratpuffer pH 9,5	Tris HCl	100 mM
	Magnesiumchlorid	0,5 mM
<b>Membranisolation von <i>E. coli</i></b>		
Aprotininlösung	Aprotinin	10 mg/mL
DNase I-Lösung	DNase I	1 mg/mL
EDTA-Lösung	EDTA	10 mM
Extraktionspuffer	Triton X 100	2 %
	Tris/HCl	50 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Lysozym-Lösung	Lysozym	10 mg/mL
Resuspensionspuffer	Tris/HCl pH 8	200 mM
Saccharoselösung	Saccharose	1 M
Trypsinlösung	Trypsin	2,5 %
Aktivierungslösung	Calciumchlorid	1M

**Tabelle 3.3:** Lösungen und Puffer (fortgesetzt)

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
<b>PCR</b>		
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot	10 mM
<b>Panning</b>		
Blocklösung	Milchpulver	2 % (w/v)
	PBST	1x
Blocklösung Array	Ethanolamin	50 % (v/v)
Phagenfällung	PEG 6000	20 % (w/v)
	NaCl	2,5 M
Phagenpuffer pH 7,5	Tris-HCl	10 mM
	NaCl	20 mM
	EDTA	2 mM
Präinkubationslösung	Milchpulver	1 % (w/v)
	BSA	1 % (w/v)
	PBST	1 x; 0,1 %
Trypsin-Lösung	Trypsin	10 µg/mL
	PBS	1x
<b>Säugerzellkultur-Lösungen</b>		
PEI	Polyethylenimin linear 25 kDa (Polysciences)	1 g/l
Trypanblau-Färbelösung	Trypanblau	0,1 % (w/v)
	PBS	1 x
<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>		
Acrylamidmix	Acrylamid	30 % (w/v)
	Bisacrylamid	0,8 % (w/v)
APS-Lösung	Ammoniumpersulfat	10 % (w/v)

**Tabelle 3.3:** Lösungen und Puffer (fortgesetzt)

Bezeichnung	Komponente	Konzentration
Laemmli-Puffer (5x)	( $\beta$ -Merkaptoethanol)	15 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	SDS	10 % (w/v)
Laufpuffer mit SDS pH 8,3	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	Tris HCl	25 mM
Protein-Massenstandard	Precision Protein ladder	AllBlue und Un-stained
SDS-Lösung	SDS	10 % (w/v)
Tris HCl-Lösung pH 6,8 (Sammelgel)	Tris HCl	1 M
Tris HCl-Lösung pH 8,8 (Trenngel)	Tris HCl	1,5 M
<b>Western Blot</b>		
Laufpuffer pH 8,3	Glycin	192 mM
	Tris HCl	25 mM

### 3.1.5 Nährmedien und Supplemente

**Tabelle 3.4:** Nährmedien und Supplemente

Medium/Supplement	Komponente	Konzentration
<b>Kultivierung von <i>Escherichia coli</i></b>		
2xYT Agar	Bacto-Agar in 2xYT Medium	1,5 % (w/v)
2xYT Medium (pH 7,0)	Bacto-Hefeextrakt	1,0 % (w/v)
	Bacto-Trypton	1,6 % (w/v)
	Natriumchlorid	0,05 % (w/v)

**Tabelle 3.4:** Nährmedien und Supplemente (fortgesetzt)

Medium/Supplement	Komponente	Konzentration
2xYT-G-X Medium	2xYT Medium (pH 7,0)	-
	Antibiotikum X	1x
	Glukose	100 mM
Ampicillin (1000x)		100 g/L
Glukoselösung (20x)		2 M
IPTG-Lösung (20.000x)		1 M
Kanamycin (1000x)		50 g/L
LB Medium	Bacto-Hefeextrakt	5 g/L
	Bacto-Trypton	10 g/L
	Natriumchlorid	10 g/L
SOC Medium	Bacto-Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	Bacto-Trypton	2,0 % (w/v)
	Natriumchlorid	0,005 % (w/v)
	Magnesiumchlorid	20 mM
	Glukose	20 mM
Tetracyclin (500x)		50 g/L
<b>Kultivierung von Säugerzellen</b>		
F17 Medium (Kulturmedium)	FreeStyle F17 Expressionsmedium (Invitrogen, Darmstadt)	1x
	G418	25 mg/L
	L-Glutamin (PAA, Pasching, AUS)	7,5 mM
	Pluronic F-68 (AppliChem, Darmstadt)	0,1 % (v/v)
F17 Medium (Fütterung nach 48 h)	FreeStyle F17 Expressionsmedium (Invitrogen, Darmstadt)	1x
	L-Glutamin (PAA, Pasching, AUS)	7,5 mM

**Tabelle 3.4:** Nährmedien und Supplemente (fortgesetzt)

Medium/Supplement	Komponente	Konzentration
	Pluronic F-68 (AppliChem, Darmstadt)	0,1 % (v/v)
	Trypton N1 (PAA, Pasching, AUS)	0,1 % (w/v)
F17 Medium (Transfektionsmedium)	FreeStyle F17 Expressionsmedium (Invitrogen, Darmstadt)	1x
	L-Glutamin (PAA, Pasching, AUS)	7,5 mM
	Pluronic F-68 (AppliChem, Darmstadt)	0,1 % (v/v)
Pluronic-F68-Stammlösung (100x)	Pluronic-F68 (AppliChem, Darmstadt)	10 % (w/v)
Trypton N1-Stammlösung	FreeStyle F17 Expressionsmedium (Invitrogen, Darmstadt)	1 x
	TN1 Trypton (Organotechnie S.A.S.)	20 % (w/v)

### 3.1.6 Software

**Tabelle 3.5:** Software und Datenbanken

Software/Datenbank	Anwendung/Referenz
Geneious	Erstellen von Vektorkarten, Auswertung von Sequenzierungen; Biomatters, Auckland (Neuseeland)
Genepix Pro 6	Auswertung von Microarrays; Molecular Devices, Sunnyvale (USA)
LibreOffice 4.2	Zeichnungen, Protokolle; The Document Foundation, Berlin
Mendeley Desktop	Literaturverwaltung; Mendeley Ltd., London (UK)



**Tabelle 3.5:** Software und Datenbanken (fortgesetzt)

Software/Datenbank	Anwendung/Referenz
MultAlign	Hierarchischer Sequenzvergleich; [Corpet, 1988] ( <a href="http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin">http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin</a> )
NCBI	Datenbank für Gen- und Proteinsequenzen; <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Prism 6	Diagramme; GraphPad Software, La Jolla (USA)
Unicorn 5.10	Chromatographieauswertung; GE Healthcare, München
UniProt	Proteinsequenzen; <a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>
VBASE2	Analyse von Antikörpersequenzen; [Retter et al., 2005] ( <a href="http://www.vbase2.org">http://www.vbase2.org</a> )
Vector NTI Suite 10	Erstellen von Vektorkarten; ThermoFisherScientific, Offenbach

### 3.1.7 Kommerzielle Kits

**Tabelle 3.6:** Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab, Erlangen

### 3.1.8 Chromatographiesäulen

**Tabelle 3.7:** Chromatographiesäulen

Kit	Hersteller
Protein A-Säule, BioScale Mini UNOsphere SUPrA 1 mL	BioRad, Hercules (USA)
Entsalzungssäule, BioScale Mini Bio-Gel P-6 Desalting 10 mL	BioRad, Hercules (USA)
Präparative SEC-Säule, Superdex 200 HiLoad 16/60	GE Healthcare, München
Analytische SEC-Säule, Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, München

### 3.1.9 Enzyme

**Tabelle 3.8:** Enzyme

Enzym	Hersteller
Kälberdarmphosphatase (CIP)	New England BioLabs, Frankfurt
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes, Keilaranta (Finnland)
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs, Frankfurt Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
Trypsin	Carl Roth, Karlsruhe
GoTaq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

## 3.1.10 Antigene und Antikörper

**Tabelle 3.9:** Antigene

Antigen	Uniprot-ID	Hersteller
BMX/AS1-122	P51813	Emma Hansson, Karolinska Institutet (Schweden)
BSA	P02769	Sigma-Aldrich, München
CHIN/AS1-167	P15882	Emma Hansson, Karolinska Institutet (Schweden)
Lysozym	P00698	Carl Roth, Karlsruhe
MUC1/16mer	P15941	Ronald Frank, HZI Braunschweig
PTK6/AS1-122	Q13882	Emma Hansson, Karolinska Institutet (Schweden)
SH21A/AS1-108	O60880	Emma Hansson, Karolinska Institutet (Schweden)
TENS1/AS1-136	Q9HBL0	Emma Hansson, Karolinska Institutet (Schweden)

**Tabelle 3.10:** Antikörper

Antikörper	Hersteller (Art.#)
Maus $\alpha$ -c-myc-Tag (9E10)	TU Braunschweig, AG Dübel
Maus $\alpha$ -M13-HRP	GE Healthcare, München (27-9421-01)
Ziege $\alpha$ -Maus IgG (Fc-spez.)-AP	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) (A2429)
Ziege $\alpha$ -Maus IgG (Fc-spez.)-HRP	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) (A0168)
Ziege $\alpha$ -human IgG (Fc-spez.)-AP	Dianova, Hamburg (109-055-098)
Ziege $\alpha$ -human IgG (Fc-spez.)-HRP	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) (A0170)
Ziege $\alpha$ -human IgG (Fc-spez.)-FITC	Dianova, Hamburg (109-095-098)

**Tabelle 3.10:** Antikörper (fortgesetzt)

Antikörper	Hersteller (Art.#)
Ziege $\alpha$ -human IgG (Fc-spez.)-Cy3	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) (C2571)
Ziege $\alpha$ -human IgG (Fc-spez.)-Cy5	Dianova, Hamburg (115-175-071)

### 3.1.11 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Zelllinien

**Tabelle 3.11:** Bakterienstämme, Bakteriophagen und Zelllinien

Bezeichnung	Genotyp/Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> XL-1 Blue MRF'	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^q \text{ Z}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^R\text{)]}$	Stratagene, La Jolla (USA)
<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B F- dcm ompT hsdS( <sub>rk</sub> - <sub>mB</sub> -) gal [malB+]K-12( $\Delta$ S)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \Delta 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta\text{lacX74 recA1 araD139 } \Delta(\text{ara leu}) 7697 \text{ galU galK rpsL (Str}^R\text{) endA1 nupG}$	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
<i>E. coli</i> TOP10F'	F'( $\text{lacI}^q \text{ Tn10 (Tet}^R\text{) mcrA } \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \Delta 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta\text{lacX74 recA1 araD139 } \Delta(\text{ara-leu})7697 \text{ galU galK rpsL endA1 nupG}$ )	Thermo Fisher Scientific, Offenbach
<i>E. coli</i> TG1	supE thi-1 $\Delta(\text{lac-proAB}) \Delta(\text{mcrB-hsdSM})5 (\text{rk-mK-}) [\text{F}\Delta\text{traD36 proAB lacI}^q \text{ Z}\Delta\text{M15}]$	
Hyperphage	Helferphage zur polyvalenten Präsentation von scFv	[Rondot et al., 2001]
M13K07	Helferphage zur monovalenten Präsentation von scFv	[Vieira & Messing, 1987]

**Tabelle 3.11:** Bakterienstämme, Bakteriophagen und Zelllinien (fortgesetzt)

Bezeichnung	Genotyp/Eigenschaften	Referenz
HEK293-6E	Humane embryonale Nierenzelllinie, adaptiert an Suspension	[Durocher et al., 2002, Loignon et al., 2008]

### 3.1.12 Vektoren

**Tabelle 3.12:** Vektoren

Bezeichnung	Verwendung
pCSE2.5-hIgG1-Fc-XP	Vektor für die Expression von scFv-Fc-Fusionen in HEK293-6E Zellen [Jäger et al., 2013]
pHAL14	Phagemid, Phagen-Display, Expression von scFv in <i>E. coli</i> (His6-myc) [Hust et al., 2011]
pHAL30	Phagemid, Phagen-Display, Expression von scFv in <i>E. coli</i> (myc-His6)
pOmpA	Vektor für die Oberflächenexpression in <i>E. coli</i> durch OmpA
pOmpU	Vektor für die Oberflächenexpression in <i>E. coli</i> durch OmpU

### 3.1.13 Oligonukleotide

**Tabelle 3.13:** Oligonukleotide

#	Sequenz 5'-3'	Verwendung
11rev	CTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC	scFv-Screening, Sequenzierung
12fw	CGTCTTCACCTCGAGAGC	Infektions-Screening
125fw	GGCTCGTATGTTGTGTGG	scFv-Screening, Sequenzierung
361fw	AAGAGCGCGCATTCTCAAGTTC AGCTGCAGCAGTCT	Infektions-Screening

**Tabelle 3.13:** Oligonukleotide (fortgesetzt)

#	Sequenz 5'-3'	Verwendung
410fw	CACTTTGCCTTTCTCTCC	Sequenzierung pCSE2.5-hIgG1-Fc
411rev	CAGATGGCTGGCAACTAG	Sequenzierung scFv in pCSE2.5-hIgG1-Fc
1907fw	AAATCGATCAGGGTATCAACC-CGTATGTTGGCTTTGAAA	Amplifikation von ompA
1922fw	CACACAGAATT-CATTAAAGAGGAGAAATTAAC-CATGAAAG	Generierung von LPP mit <i>EcoRI</i> vor dem Gen
1987rev	CTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGCGGCCGCTACTCACC	Amplifikation mey-tag
1988rev	GGCCGCTACTCACCGTTCTTC-CATGGGCCTGGGATGCCGT	Amplifikation MCS für pOmpA3
1991fw	CAAGGCCCATGGATGTCAT-CTGAAGAAGAGGAAAACCTGG	Amplifikation von BMX, <i>NcoI</i> vor dem Gen
1992rev	GACATCGCGGCCGCTGGACA-CAGAGTCGGGGACCTTGTTG	Amplifikation von BMX, <i>NotI</i> nach dem Gen
2079fw	CAAGGCCCATGGCCTC-CTGTTTGGAATCTTACTTATATC	Amplifikation von CHIN, <i>NcoI</i> vor dem Gen
2168fw	CGCTAATCGATCAGGGTATCAATG-CAGATGGCTACTCTCTATCAGCT-ATCTACGCAATCGGCGACACTGG-CGTTAAGC	Generierung von ompU, - <i>ClaI</i> vor dem Gen
2169rev	CGGCGACACTGGCGTTAAG-CTAGGTGCGGGTTACGCAGAT-CAAGATACAGCAGCGAATGCGT-CTTCTGATCAATATATGC	Generierung von ompU
2170fw	GTCTTCTGATCAATATATG-CTAGCAGCGTCTTACGCTATCT-CTGATTTCTACTTCGCTGGTA-CTTTTGTTGATGGTCAAG	Generierung von ompU
2171fw	CGTCCGAATTCAAAAGCTACTAAA-CTGG	Generierung von LPP mit <i>EcoRI</i> vor dem Gen

**Tabelle 3.13:** Oligonukleotide (fortgesetzt)

#	Sequenz 5'-3'	Verwendung
2172rev	CTAGAGGCCTGTGCTAATGAGGAT- CCATACCG	Amplifikation von ompA, <i>Bam</i> HI nach dem Gen
2173rev	CTTTTGTTGATGGTCAAGGCATCC- CAGGCCCATGGTATGC	Amplifikation von ompU, <i>Nco</i> I nach dem Gen
2174fw	CGCTAATCGATCAGGGTATCAATG- CAGATGGCTACTCTC	Amplifikation von ompU, - <i>Cla</i> I vor dem Gen
2215rev	GATATTGCGGCCGCTCCCATC- CTGGCCTGTAGAATCTC	Amplifikation von CHIN, <i>Not</i> I nach dem Gen

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### *Sterilisation*

Alle zur Lagerung und Kultivierung verschiedener *E. coli*-Stämme verwendeten Nährmedien, Verbrauchsmittel und Behältnisse wurden für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck Dampfdruck-sterilisiert. Hitzesensitive Substanzen wurden mit 0,2 µm-Filtern filtriert und dem Medium unter sterilen Bedingungen zugefügt.

#### *Kultivierung von Escherichia coli*

Die *E. coli*-Stämme wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 37 °C und 250 rpm in 2xYT-Medium oder LB-Medium kultiviert. Glukose und Antibiotika wurden je nach Versuchsziel hinzugegeben. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die optische Dichte (OD) der Kultursuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen unbewachsenes Medium bestimmt. Dabei entsprach eine OD 0,5 einer Zelldichte von  $5 \times 10^8$  Zellen/mL. Plattenkulturen wurden durch Ausstreichen mit einer sterilen Impfföse angelegt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C über Nacht, die Lagerung bei 4°C.

#### *Lagerung von Escherichia coli*

Die kurzzeitige Lagerung von *E. coli*-Stämmen erfolgte auf Festmedien bei 4 °C. Für die langfristige Lagerung wurden Gefrierkulturen durch Zugabe von 20 % (v/v) Glycerin zur Kultursuspension angelegt und bei -80 °C gelagert.

#### *Herstellung chemisch-kompetenter E. coli*

Aus einer Übernachtskultur wurden 20 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde in ein steriles Polypropylengefäß überführt und für 20 min auf Eis gelagert, bevor die Zellen bei 4000 rpm, 4 °C für 4 min pelletiert



### 3 Material und Methoden

wurden. Nach Resuspension in 10 mL eiskalter 75 mM Calciumchloridlösung wurden die Zellen für eine Stunde auf Eis gelagert und erneut bei 4000xg, 4 °C für 4 min pelletiert. Die Zellen wurden in 2 mL 75 mM Calciumchloridlösung mit 10% Glycerin resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

#### *Transformation von E. coli mittels Hitzeschock*

Zur Transformation von Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen in *E. coli*-Stämme wurden chemisch kompetente Zellen verwendet, die zunächst auf Eis aufgetaut und dann mit der DNA für 20 min auf Eis inkubiert wurden. Nach dem Hitzeschock für 50 s bei 42 °C wurden die Zellen auf Eis gekühlt und mit 500 µL vorgewärmtem SOC-Medium für 45-60 min bei 37 °C und 650 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf 2xYT-Agar mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **3.2.2 Panning mit scFv-Phagen-Bibliotheken**

Die Immobilisierung der Antigene erfolgte entweder auf 96-Well Polystyrolplatten oder auf 96-pin Polystyrolplatten. Hierzu wurden jeweils 5 µg Antigen in einem Gesamtvolumen von 100 µL PBS in die einzelnen Wells der 96-Well Mikrotiterplatten gegeben bzw. die Pins in 200 µL eingetaucht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Freie Bindungsstellen wurden dann bei einer Inkubation der Wells/Pins für 2 h bei Raumtemperatur mit 360 µL Blocklösung abgesättigt.

Um die Selektion von Phagen aus den Antikörperphagen-Bibliotheken mit erhöhter Unspezifität oder Reaktion mit Milchpulver zu vermeiden, wurden 5 µg BSA immobilisiert und mit 360 µL Blocklösung abgesättigt. In dieses Well wurden dann jeweils  $5 \times 10^{11}$  Phagen für 1 h in 100 µL Blocklösung präabsorbiert. Nach dem Waschen der geblockten Wells (3x mit PBS/0,05 % Tween20) wurden die präabsorbierten Phagen in die Wells bzw. Wells mit Pins mit immobilisiertem Antigen überführt. Die Wasch-

### 3 Material und Methoden

prozedur an den 96-Pin Mikrotiterplatten wurde dabei von Hand durchgeführt (1 L mit PBS/0,05 % Tween20).

Die Inkubation der Phagen auf den Antigenen erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur. Nicht oder nur schwach gebundene Phagen wurden in einem intensiven Waschschrift am ELISA-Washer (10 x mit 1 x PBS/0,05 % Tween 20) entfernt. Die gebundenen Phagen wurden durch 30-minütige Inkubation mit 200  $\mu$ L Trypsin (10  $\mu$ g/mL) bei 37 °C eluiert und damit *E. coli* TG1-Zellen infiziert. Dazu wurden aus einer TG1-Flüssigkultur mit einer mit OD<sub>600 nm</sub> von 0,5 jeweils 135  $\mu$ L entnommen und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte verteilt. Die Platte wurde anschließend zur Infektion der Bakterien für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Danach wurden in jede Vertiefung 20  $\mu$ L einer 10x Glucose-Ampicillin-Lösung gegeben und die Platte für 16-18 h bei 30 °C und 800 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Die infizierten *E. coli*-Zellen wurden dann zur Produktion von Phagenpartikeln für die nächste Panningrunde genutzt (s.u.). Insgesamt wurden drei Panning-Runden durchgeführt, in denen die Menge an immobilisiertem Antigen von 5  $\mu$ g auf 2  $\mu$ g bzw. 1  $\mu$ g reduziert wurde. Zusätzlich wurde der Waschschrift zum Entfernen nicht oder nur schwach gebundener Phagen in jeder Runde intensiviert (20x in Runde 2 und 30x in Runde 3).

#### *Produktion von scFv-Phagen in E. coli*

Mit scFv-Phagen infizierte *E. coli*-Zellen wurden zur Produktion neuer Phagenpartikel genutzt. Im kleinen Maßstab wurden 195  $\mu$ L 2xYT-GA-Medium mit 5  $\mu$ L Übernachtskultur in 96-Well Polypropylen-Rundbodenplatten inokuliert. Nach Inkubation im Thermoschüttler bei 37 °C und 800 rpm bis OD<sub>600</sub> 0,5 wurden die Zellen mit 10<sup>9</sup> M13K07-Helferphagen infiziert. Auf eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C ohne Schütteln folgte eine Inkubation bei 800 rpm und ein Mediumswechsel auf 180  $\mu$ L 2xYT-AK. Die Phagenproduktion erfolgte über Nacht bei 30 °C/800 rpm.

### 3 Material und Methoden

Im größeren Maßstab wurden 200 mL 2xYT-GA-Medium im Schüttelkolben auf  $OD_{600nm}$  0,15 angeimpft und bei  $OD_{600nm}$  0,5 mit  $10^9$  M13K07-Helferphagen infiziert. Nach der Inkubation erfolgte die Produktion in 200 mL 2xYT-AK über Nacht bei 250 rpm und 37 °C. Der Phagenüberstand wurde entweder direkt genutzt oder das Volumen zunächst durch Phagenfällung reduziert.

#### *Phagenfällung*

Die Phagen wurden durch Inkubation mit 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lösung auf einer Wippe bei 4°C für 1 h gefällt. Nach der Sedimentation der Phagen bei 10.000xg bei 4 °C für 1 h wurde das Phagenpellet in 10 mL Phagenpuffer aufgenommen. Noch enthaltene Zellen und Zelltrümmer wurden bei 16.000xg und 4°C für 30 min pelletiert. Die im Überstand befindlichen Phagen wurden mit 1/5 Volumen PEG/NaCl-Lösung für 20 min auf der Wippe gefällt und anschließend bei 16.000xg und 4 °C für 30 min pelletiert. Das Pellet wurde in 1 mL Phagenpuffer resuspendiert und bei 16.000xg für eine Minute zentrifugiert. Zusätzlich wurde der Phagenüberstand mit einem 0,45 µm-Filter filtriert, um verbliebene *E. coli*-Zellen abzutrennen. Die Phagen wurden bei 4 °C gelagert.

#### *Produktion löslicher scFv-Antikörperfragmente in E. coli*

Für das Screenen von potentiellen Bindern nach dem Panningprozess wurden lösliche scFvs im kleinen Maßstab in 96-Well Polypropylen-Rundbodenplatten produziert. 150 µL 2xYT-GA-Medium wurden mit einer Kolonie angeimpft und mit einer luftdurchlässigen Membran über Nacht bei 34 °C und 800 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Aus der Übernachtskultur wurden 180 µL 2xYT-GA-Medium mit 10 µL überimpft und wiederum für 2 h bei 37 °C und 800 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Nach Induktion durch Mediumswechsel auf 180 µL 2xYT-AI-Medium erfolgte die Produktion über Nacht bei 30 °C und 800 rpm. Für weitere Anwendungen nach dem Screenen wurden lösliches scFvs in 24-Well-Rundbodenplatten produziert, wobei 4-5 mL 2xYT-GA-Medium mit der gesamten Übernachtskultur angeimpft und

### 3 Material und Methoden

schließlich durch Mediumswechsel auf 4-5 mL 2xYT-AI-Medium induziert wurden.

#### *Titerbestimmung von Phagen und scFv-Phagen*

Zur Bestimmung der Zahl infektiöser Phagen wurde die Kolonienzahl nach Infektion von *E. coli* XL1-Blue MRF' bestimmt. Dafür wurden die Zellen in 2xYT-Medium bei 37 °C und 250 rpm bis OD<sub>600nm</sub> 0,5 inkubiert und 50 µL der Kultur mit 10 µL der zuvor in PBS angesetzten Phagenverdünnungen für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf 2xYT-Agarplatten mit Kanamycin (für M13K07 und Hyperphage) oder Ampicillin (für scFv-Phagen und Phagemid-tragende Phagen) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch die Auszählung der Kolonien wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung der Phagentiter bestimmt.

### 3.2.3 Zellbiologische Methoden

#### *Kultivierung von HEK293-6E-Zellen*

Die Zellen wurden in Polycarbonat-Erlenmeyerkolben mit Ventildeckel in serumfreiem Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 110 rpm kultiviert. Zur Bestimmung der Zellzahl und zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurden Zellsuspensionen mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauerzählkammer analysiert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage gesplittet und die Zellzahl für die Transfektion auf 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> Zellen/mL eingestellt.

#### *Produktion von Proteinen in HEK293-6E-Zellen*

Zur Proteinproduktion in HEK293-6E-Zellen wurden diese mit der entsprechenden Plasmid-DNA transient transfiziert. Dafür wurden 25 µg Plasmid-DNA und 62,5 µL des Transfektionsreagenz Polyethylenimin PEI (1 mg/mL) separat mit je 1,25 mL F17-Transfektionsmedium (F17-Medium mit 7,5 mM L-Glutamin und 0,1 % (w/v) Pluronic-F68) gemischt und anschließend vereinigt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Transfektionsansätze zu den Zellen gegeben und die Zellsuspensionen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 110 rpm weiterkultiviert. Nach 48 h

folgte eine Zufütterung von 50 % (v/v) Kultivierungsmedium sowie 0,5 % (w/v) TN1-Pepton. Die Kultivierung wurde weitere 72 Stunden fortgesetzt und der Kulturüberstand durch Zentrifugation für 30 min bei 3200 xg und 4 °C gewonnen.

#### 3.2.4 Molekulargenetische Methoden

##### *Plasmidpräparation*

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit den Kits peq-GOLD Plasmid Miniprep Kit I und II, NucleoSpin Plasmid und NucleoBond Xtra Midi aus *E. coli* Übernachtskulturen.

##### *Bestimmung der DNA-Konzentration*

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch am NanoDrop ND1.000 bestimmt, wobei eine Absorption von 1 bei 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 ng/μL (doppelsträngige DNA) entsprach.

##### *Polymerasekettenreaktion (PCR)*

Bei der präparativen PCR wurden Genfragmente zur Klonierung in Vektoren amplifiziert und dabei spezielle Linker und/oder Restriktionsschnittstellen durch Primer angefügt. Die analytische Kolonie-PCR diente dem Nachweis der erfolgreichen Umklonierung.

Die Zusammensetzungen der PCR-Ansätze und die verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 3.14, Tabelle 3.15 und Tabelle 3.16 wiedergegeben.

**Tabelle 3.14:** Zusammensetzung der PCR-Ansätze

Komponente	präparative PCR	analytische PCR
Polymerase	Phusion 2 U/ $\mu$ L	GoTaq 5 U/ $\mu$ L
Probenmenge	1 ng Pasmid-DNA	gepickte Kolonie
Puffer 5x	HF 10 $\mu$ L	Flexi 2 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	–	0,8 $\mu$ L
Primer forward (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
Primer reverse (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
dNTP (je 10 mM)	1 $\mu$ L	0,2 $\mu$ L
Polymerase	0,5 $\mu$ L	0,05 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ L	5,95 $\mu$ L
Gesamt	50 $\mu$ L	10 $\mu$ L

**Tabelle 3.15:** Temperaturprofil praeparative PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
98 °C	1 min	25
98 °C	15 s	
50-72 °C	20 s	
72 °C	30 s pro 1000 bp	
72 °C	5 min	

**Tabelle 3.16:** Temperaturprofil analytische PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	2 min	25
94 °C	15 s	
50-56 °C	20 s	
72 °C	1 min pro 1000 bp	
72 °C	5 min	

#### *Agarose-Gelelektrophorese*

Die Größenauftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und anschließend in 0,7-2 % (w/v) Agarosegelen mit 25 mM Ethidiumbromid in 1 x TAE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt (130 V, 400 mA, 30 min). Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte durch Vergleich mit dem DNA-Standard GeneRuler 1 kB Plus in einem Transilluminator unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm.

#### *Reinigung von DNA-Proben*

Die Reinigung von DNA-Proben erfolgte mit dem Kit NucleoSpin Extract II gemäß Herstellerangaben.

#### *Präzipitation von DNA*

Zur Präzipitation von DNA in wässriger Lösung wurden 100 µL mit 10 µL 3 M Natriumacetat und 250 µL Ethanol für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 16.000xg und 4°C wurde das DNA-Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 16.000xg und 4°C wurde das DNA-Pellet getrocknet und im gewünschten Volumen aufgenommen.

### 3 Material und Methoden

#### *Restriktionsverdau und Dephosphorylierung*

Der Restriktionverdau erfolgte nach Herstellerangaben für 2 h bei 37 °C soweit nicht anders angegeben. Um eine Religation des geschnittenen Vektors zu vermeiden, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen durch zwei 30-minütige Inkubationen mit je 0,5 µL Kälberdarmprotease (*calf intestine protease*, CIP) entfernt.

#### *Ligation*

Die komplementären Enden der linearisierten DNA-Elemente wurden mit T4-DNA-Ligase verknüpft. Dabei wurden Vektor und Insert im molaren Verhältnis von 1 zu 3 im gemäß Herstellerangaben vorbereiteten Ligationsansatz eingesetzt, der bei 16 °C über Nacht inkubiert und anschließend für 10 min bei 65 °C inaktiviert wurde.

#### *DNA-Sequenzierung*

Isolierte Plasmide wurden durch die Firmen GATC und Seqlab sequenziert und die erhaltenen Chromatogramme der DNA-Sequenzen mit der Software Geneious ausgewertet.

### 3.2.5 Proteinbiochemische und -biophysikalische Methoden

#### *Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Für reduzierende Bedingungen wurde die Proteinprobe mit Laemmli-Puffer mit beta-Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Für nicht reduzierende Bedingungen wurde die Proteinprobe mit Laemmli-Puffer ohne  $\beta$ -ME versetzt und für 10 min bei 56 °C erhitzt. Zur Bestimmung der apparenten molekularen Massen wurde der Proteinstandard Precision Protein ladder mit aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 20 mA und 400 V für 50 min in diskontinuierlichen Gelen mit der in Tabelle 3.17 aufgeführten Zusammensetzung.



**Tabelle 3.17:** Zusammensetzung von SDS-Gelen

Komponente	Sammelgel	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %
H <sub>2</sub> O [mL]	1	1,3	0,9
Acrylamidmix [mL]	0,26	1,6	2
1,0 M Tris HCl pH 6,8 [mL]	0,2	-	-
1,5 M Tris HCl pH 8,8 [mL]	-	1	1
10 % SDS [mL]	0,015	0,04	0,04
10 % APS [mL]	0,015	0,04	0,04
TEMED [mL]	0,002	0,004	0,004

#### *Coomassie-Färbung von Proteingelen*

Die nach molekularer Masse aufgetrennten Proteine im Polyacrylamid-Gel wurden mit Coomassie-Färbelösung angefärbt. Das Gel wurde dazu in 20 mL Färbelösung bis zum Kochen in der Mikrowelle erhitzt, die Färbelösung abgegossen und das Gel mit H<sub>2</sub>O entfärbt.

#### *Western Blot*

Die Proteinbanden im SDS-Gel wurden im Semi-Dry-Verfahren auf eine zuvor in Ethanol aktivierte PVDF-Membran übertragen. Dafür wurden ein in Blotpuffer getränktes Filterpapier, die PVDF-Membran, das SDS-Gel und ein weiteres Filterpapier übereinander geschichtet und für 30 min eine Spannung von 20 V (0,8 mA pro cm<sup>2</sup>) angelegt.

#### *Immunfärbung*

Die auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine wurden mittels Immunfärbung nachgewiesen. Dazu wurde die Membran in der SNAP i.d. gemäß Herstellerangaben zunächst geblockt und dann mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde die Membran je nach Konjugation des Sekundäranti-

### 3 Material und Methoden

körpers entweder mit je 1/100 (v/v) NBT/BCIP in AP-Substratpuffer entwickelt (AP-konjugierte Sekundärantikörper) oder mit DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HRP-Substratpuffer (HRP-konjugierte Sekundärantikörper) entwickelt. Die Reaktion wurde durch gründliches Spülen mit Wasser gestoppt.

#### *Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)*

Alle ELISA wurden in 96-Well Mikrotiterplatten mit verschiedenen Oberflächen durchgeführt. Das nachzuweisende Protein wurde mit 200 ng bis 500 ng pro 100 µL PBS bei 4 °C über Nacht in den Vertiefungen immobilisiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch Ausschlagen der Platte entfernt und freie Bindungsstellen durch Inkubation mit 360 µL Blocklösung für 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt, gefolgt von der Inkubation mit den Nachweisproteinen in 100 µL Blockpuffer für jeweils 2 h bei Raumtemperatur. Der Nachweis erfolgte über einen HRP-konjugierten Antikörper. Nach dem Blocken und jeder Inkubation wurde dreimal mit Waschpuffer im ELISA-Washer gewaschen. Die Detektionsreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µL Entwicklerlösung je Vertiefung und wurde bei ausreichender Färbung mit 100 µL Stopplösung beendet.

In Tabelle 3.18 sind die unterschiedlichen angewendeten ELISA mit den eingesetzten Antikörpern aufgelistet. Während beim Screening-ELISA nur eine Ja-Nein-Antwort erwartet wird, kann im Titrations-ELISA durch eine Verdünnungsreihe definierter Erstantikörperkonzentration eine Aussage über die Bindungseigenschaften erzielt werden. Der Phagen-ELISA basiert auf der direkten Immobilisierung von Phagen an die Polystyroloberfläche und den quantitativen Nachweis über das pVIII-Hüllprotein. Als Referenz für die Anzahl der Phagen dient eine M13K07-Präparation, deren Phagentiter zuvor durch Infektion bestimmt wurde.

**Tabelle 3.18:** Übersicht der eingesetzten ELISA

	<b>Screening- ELISA</b>	<b>Titration- ELISA</b>	<b>Phagen- ELISA</b>
Immobilisiert	Antigen	Antigen	Phagen
1. Antikörper	scFv	scFv/scFv-Fc-AK	–
2. Antikörper	$\alpha$ -myc	$\alpha$ -myc/–	–
3. Antikörper	$\alpha$ -mouse-IgG1- HRP	$\alpha$ -mouse-IgG1- HRP/ $\alpha$ -human- IgG1-HRP	$\alpha$ -M13-HRP

#### *Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatografie*

In HEK293-6E-Zellen produzierte humane scFv-Fc-Fusionsproteine wurden mittels Affinitätschromatografie aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Dafür wurde am Profinia-Reinigungssystem (Bio-Rad) eine 1 mL Protein A-Säule für die Bindung an das Fc-Fragment und eine 10 mL Gelfiltrationssäule zur Entsalzung verwendet. Nach der Reinigung wurde die Proteinkonzentration mittels NanoDrop ND1.000 bei einer Wellenlänge von 280 nm photometrisch bestimmt. Die Proben wurden 0,2  $\mu$ m sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### *Größenausschlusschromatographie*

Das Aggregationsverhalten, also die Bildung von Di-, Tri-, Tetra- oder Multimeren der produzierten scFv-Fc Antikörper wurde mittels präparativer und analytischer Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC) am Äkta-purifier-System untersucht. Für die präparative SEC von scFv-Fc Antikörpern wurden 1 mg Protein mit einer Flussrate von 0,3 mL/min auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60-Säule geladen. Die einzelnen Fraktionen wurden für weitere Analysen in einer 96-Well Mikrotiterplatte aufgefangen. Für die analytische SEC von scFv-Fc Antikörpern wurden die Monomerfraktionen aus der präparativen SEC nach 3-monatiger Lagerung bei 4 °C auf einer Superdex 200 10/300 GL-Säule bei 0,75 mL/min analysiert. Der Verlauf der Absorption bei einer Wellenlänge von

### 3 Material und Methoden

280 nm wurde in Korrelation mit einer zuvor durchgeführten Kalibrierung mit Proteinen definierter Größe ausgewertet.

#### *Außenmembranisolation von E. coli*

Zur Präsentation von Antigenen auf der Oberfläche von *E. coli* wurden 20 mL Übernachtskultur in 2YT-Medium mit Glukose und Ampicillin bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Die Hauptkultur in unterschiedlichen Medien wurde auf OD<sub>600 nm</sub> 0,2 angeimpft und bis OD<sub>600 nm</sub> 0,5 bei 37 °C und 250 rpm inkubiert und die Temperatur dann auf 25 °C bis 37 °C eingestellt. Nach Expressionszeiten von 1 h bis 15 h wurden die Proben für 15 min bei 4 °C gelagert und die Zellen bei 5.000xg zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 5 mL 0,2 M Tris/HCl pH 8 resuspendiert und nacheinander unter Vortexen 0,1 mL 1 M Saccharose, 0,1 mL 10 mM EDTA und 0,1 mL Lysozym-Lösung (10 mg/mL) zugefügt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben auf Eis gestellt und unter Vortexen 10 µL Aprotininlösung (10 mg/mL), 5 mL Extraktionspuffer und 100 µL DNase I-Lösung (1 mg/mL) hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 4.000xg abgetrennt. Der Überstand wurde bei 30.000xg für eine Stunde zentrifugiert, das Pellet in 10 mL Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert und das Pellet letztlich in 500 µL Wasser aufgenommen für die Analyse in der SDS-PAGE.

#### *Proteaseverdau von E. coli*

Beim Verdau der Zellen mit Proteinase K wurden 12,5 µL einer Lösung (50 µg/mL) der Protease mit den in 5 mL 0,2 M Tris/HCl pH 8 resuspendierten Bakterien gemischt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Beim Verdau mit Trypsin wurden die in 5 mL 0,2 M Tris/HCl pH 8 resuspendierten Bakterien mit 600 µL einer 2,5 % igen Trypsin-Lösung versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 50 µL 1 M CaCl<sub>2</sub> weitere 30 min bei 37 °C verdaut. Die Verdaue wurden durch dreimaliges Waschen mit 0,2 M Tris/HCl pH 8 mit 10 % FCS abgestoppt.

#### 3.2.6 Protein-Microarrays

Die Protein-Microarrays wurden manuell mittel MicroCaster (GE Healthcare) auf Nexterion SlideE-Glasträger gedruckt. Dafür wurden die Nadeln zunächst mit Wasser gereinigt und mithilfe von Druckluft getrocknet. Die Antigenlösungen in PBS wurden in 96-Well Mikrotiterplatten (*low binding*) vorgelegt und nach kurzem Eintauchen der Nadeln direkt auf die Glasträger gedruckt. Die Microarrays wurden in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend mit unterschiedlichen Reagenzien freie Bindungsstellen abgeblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und spülen mit Wasser wurde der Array mit Druckluft getrocknet. Für den Bindungsnachweis wurden die Protein-Microarrays zunächst für 1,5 h mit antigenspezifischem scFv-Fc-Antikörper inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und mit Cy3- bzw. Cy5-markiertem Sekundärantikörper im Microarrayreader nachgewiesen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Panning in Mikrotiterplatten und auf Pin-Mikrotiterplatten

Für die Miniaturisierung des Panningverfahrens von der 96-Well Mikrotiterplatte (MTP) über Pin-Mikrotiterplatten hin zum Microarray als Immobilisationsfläche für Antigene wurden zunächst mögliche Zielproteine auf ihren Einsatz als Modellantikörper getestet. Es wurden sowohl Antigene genutzt, gegen die bereits erfolgreich Antikörper im Panning generiert wurden (Lysozym und MUC1), als auch ein neues Antigen. Bei diesem Antigen handelt es sich um die humane cytosolische Tyrosinkinase BMX (*bone marrow tyrosine kinase gene in chromosome X protein*), die mit chronischen Entzündungen, Gefäßerkrankungen und verschiedenen Krebsarten in Zusammenhang gebracht wird [Cenni et al., 2012].

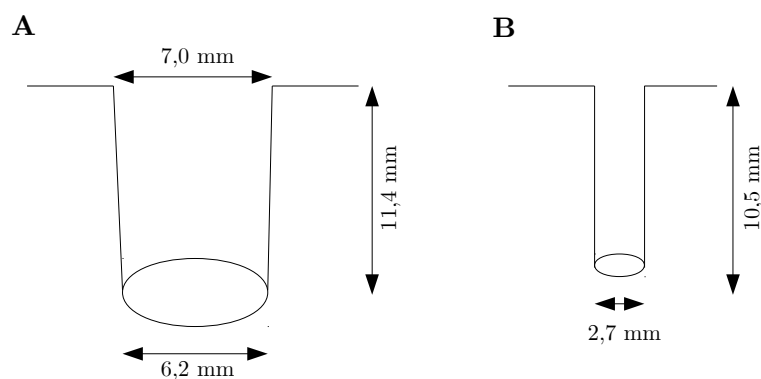
Aus diesem Grund steht BMX aktuell im Fokus der Forschung und wird auch im Rahmen des Affinomics-Konsortiums (EU FP7 Projekt 241481) untersucht. Dabei wird für die Generierung von Antikörpern nicht das gesamte Protein, sondern nur eine Domäne eingesetzt, die biotinyliert und unbiotinyliert vorliegt und in *E. coli* rekombinant hergestellt wurde. Weitere Informationen zu den eingesetzten Antigenen sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

**Tabelle 4.1:** Auflistung der eingesetzten Antigene

Antigen	Uniprot-ID	eingesetzt im Panning
BMX	P51813	Domäne AS1-122, biotinyliert und unbiotinyliert
Lysozym	P00698	Gesamtprotein
MUC1	P15941	GVTSAPDTRPAPGSTA (16mer)

#### 4.1.1 Selektion von Antikörpern mittels Antikörperphagen-Display

Mittels Phagen-Display wurden aus den scFv-Phagenbibliotheken HAL7 und HAL8 bzw. HAL9 und HAL10 gegen das Antigen BMX Antikörper in Mikrotiterplatten und Pin-Mikrotiterplatten selektiert. Dabei wurde das unbiotinylierte Antigen für das Panning in Pin-Mikrotiterplatten eingesetzt und das biotinylierte Antigen für das Panning in Mikrotiterplatten. Während die Oberflächeneigenschaften beider Plattenarten sich nicht unterscheiden, sind die zur Immobilisierung des Antigens verfügbaren Flächen verschieden (siehe Abbildung 4.1).

**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der eingesetzten Oberflächen

Beide Oberflächen bestehen aus Polystyrol mit einer hohen Bindekapazität für Proteine. (A) Maße eines Wells der Costar 96-Well Mikrotiterplatte (B) Maße eines Pins der Immuno-TSP-Mikrotiterplatte.

Die Antigene wurden an der Oberfläche von Mikrotiterplatten und Pin-Mikrotiterplatten immobilisiert und jeweils drei aufeinanderfolgende Panningrunden durchgeführt. In der ersten Panningrunde wurden 5 µg Antigen eingesetzt, in der zweiten 2 µg und in der dritten 1 µg. Zudem wurde die Waschprozedur bei den Mikrotiterplatten von 10 auf 20 und 30 Waschzyklen erhöht und bei den Pin-Mikrotiterplatten von einem auf drei Liter Spülvolumen, um die Zahl schwach gebundener scFv-Phagen zu verringern.

#### 4.1.2 Screening von monoklonalen scFv-Antikörperfragmenten

Im Anschluss an die Panningrunden auf Mikrotiterplatten und Pin-Mikrotiterplatten wurden jeweils 92 Antikörperklone aus der dritten Runde ausgewählt und lösliche scFvs für einen Screening-ELISA produziert. Klone, die im ELISA Bindung auf BMX nicht aber auf BSA als Negativkontrolle zeigten, wurden sequenziert, um die genetische Information des Antikörpers zu erhalten. Der Vergleich der Sequenzen ergab, dass besonders die scFvs AKS13-A7 und AKS50-A7 über die drei Panningrunden angereichert wurden. Von den 92 getesteten Antikörperklonen zeigten 16% die Sequenz des scFvs AKS13-A7 und 13 % die Sequenz des scFvs AKD50-A7 (siehe Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2:** Ergebnis des Screening-ELISAs nach der dritten Panningrunde

Antigen	Klon	Zahl identischer Klone
BMX biotinyliert (Mikrotiterplatte)	AKS13-A3	20
	AKS13-A7	15
	AKS13-A8	1
	AKS13-A10	3
	AKS13-B3	3
	AKS13-B7	2
	AKS13-E4	1



**Tabelle 4.2:** Ergebnis des Screening-ELISAs nach der dritten Panningrunde (fortgesetzt)

Antigen	Klon	Zahl identischer Klone
BMX unbiotinyliert (Pin-Platte)	AKS13-G4	1
	AKS50-A1	2
	AKS50-A7	12
	AKS50-A12	9
	AKS50-B3	1
	AKS50-D9	1
	AKS50-G11	1

#### 4.1.3 Charakterisierung der Antikörper-Antigen-Bindung in der Immunfärbung

Die im ELISA identifizierten scFv-Antikörper gegen BMX wurden zur weiteren Analyse in Deepwell-Platten (24 Wells) produziert. Die Antigenbindung der selektierten scFv-Antikörper wurde unter reduzierenden und nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Bedingungen und anschließendem Western Blot mit Immunfärbung überprüft. Anhand der Bindungseigenschaften können Rückschlüsse über das spezifische Epitop gezogen werden, da die BMX-Domäne unter reduzierenden Bedingungen vollständig denaturiert vorliegt und so lineare Epitope besser oder überhaupt für den Antikörper zugänglich sind. Dabei zeigen sowohl die auf biotinyliertem als auch auf unbiotinylierten BMX generierten Binder mehrheitlich Bindung unter reduzierenden Bedingungen (siehe Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3:** Bindung der scFv-Antikörper im Western Blot mit Immunfärbung

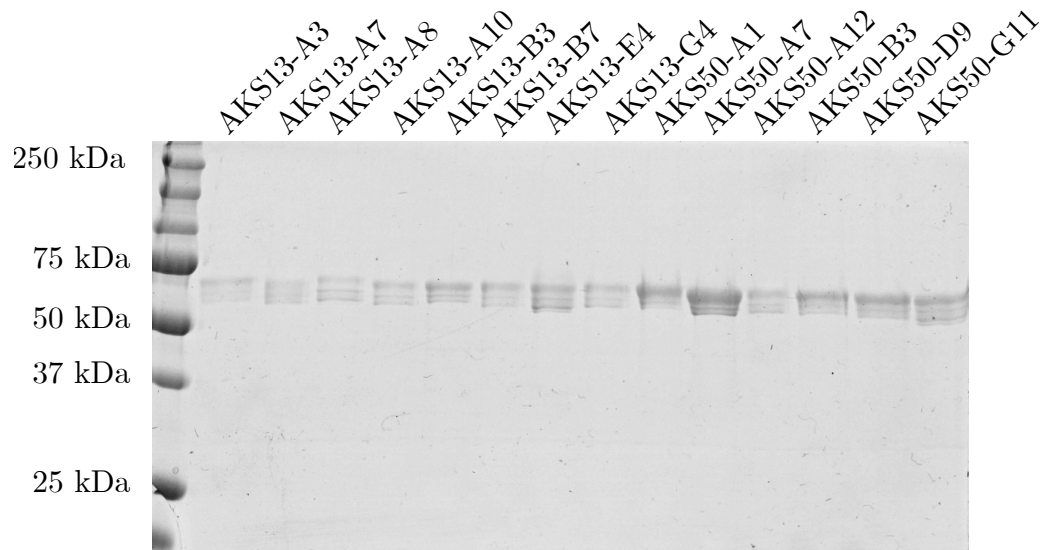
Klon	reduzierend	nicht-reduzierend
AKS13-A3	+	-
AKS13-A7	+	-
AKS13-A8	-	-
AKS13-A10	+	(+)
AKS13-B3	+	-
AKS13-B7	+	+
AKS13-E4	-	-
AKS13-G4	+	-
AKS50-A1	+	-
AKS50-A7	+	-
AKS50-A12	-	-
AKS50-B3	+	-
AKS50-D9	-	-
AKS50-G11	+	+

+ starkes Signal, - kein Signal, (+) sehr schwaches Signal

#### 4.1.4 Produktion und Reinigung von scFv-Fc-Antikörpern

Nach der Charakterisierung der scFv-Antikörper wurden ihre Gensequenzen in den Vektor pCSE2.5-hIgG1-Fc-XP zwischen sekretorisches Signalpeptid und humanen IgG1 Fc-Teil (hIgG1-Fc) kloniert, um das IgG-ähnliche bivalente scFv-Fc-Antikörperformat zu erhalten. Nach Transfektion von 25 mL HEK293-6E-Zellen wurden die scFv-Fc-Antikörper über 5 Tage produziert und anschließend mittels Protein A-Affinitätschromatografie im Profina-Reinigungssystem (Bio-Rad, München) gereinigt. Die Konzentration der gereinigten Proteine wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm ermittelt und für die Analyse per Gelelektrophorese auf 1 µg pro

Tasche eingestellt. Das apparente Molekulargewicht entsprach dabei dem zu erwartenden bei scFv-Fc-Antikörpern und es wurden keine signifikanten Verunreinigungen durch andere Proteine detektiert (siehe Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2:** Auftrennung der scFv-Fc-Antikörper per SDS-PAGE

Jeweils 1  $\mu$ g der scFv-Fc-Antikörper wurden nach der Protein-A-Reinigung mit reduzierendem Laemmli-Puffer versetzt, für 10 min auf 95 °C erhitzt und per 12 % SDS-PAGE aufgetrennt (M: 1 kb Proteinmarker). Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte durch Coomassie-Lösung.

Die Ausbeuten an gereinigten scFv-Fc-Antikörpern im Eluat der Protein A Affinitätschromatographie wurden anhand der Absorption bei 280 nm ermittelt. Die Gesamtausbeuten wurden aus der Konzentrationen der Eluate auf das Kulturvolumen von 50 mL hochgerechnet und liegen zwischen 32 mg/L und 192 mg/L. Damit konnten alle scFv-Fc-Antikörper in ausreichender Menge für weitere Analysen produziert und gereinigt werden (siehe Tabelle 4.4), jedoch nicht alle in ausreichender Konzentration für eine präparative Größenausschlusschromatographie.

**Tabelle 4.4:** Ausbeuten der produzierten scFv-Fc-Antikörper

Antikörper	Konzentration [mg/mL]	Eluat	Gesamtausbeute [mg/L]
AKS13-A3	2,4		192
AKS13-A7	1,8		144
AKS13-A8	2,4		192
AKS13-A10	0,8		64
AKS13-B3	1,6		128
AKS13-B7	2,8		224
AKS13-E4	0,9		72
AKS13-G4	1,6		128
AKS50-A1	1,0		80
AKS50-A7	1,6		128
AKS50-A12	0,4		32
AKS50-B3	1,5		120
AKS50-D9	1,2		96
AKS50-G11	0,8		64

#### 4.1.5 Auftrennung der scFv-Fc-Antikörper mittels

##### Größenausschlusschromatographie

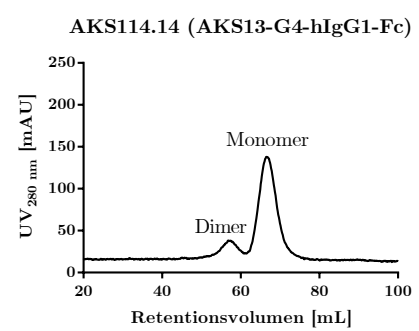
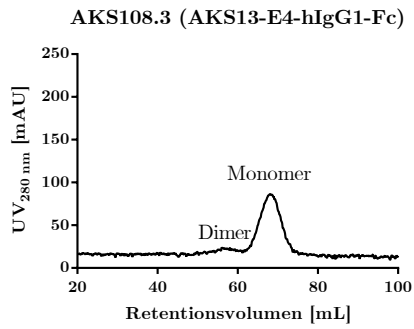
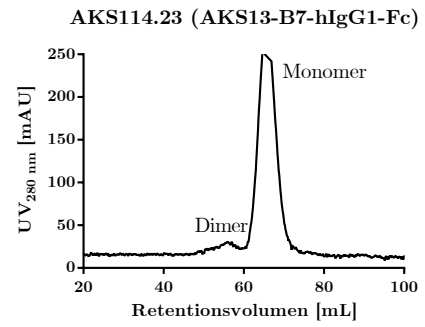
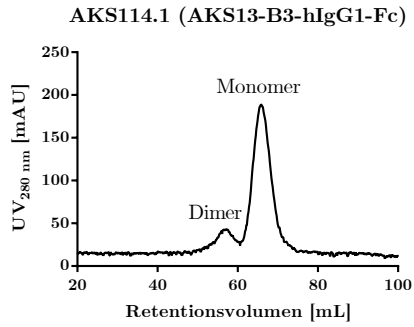
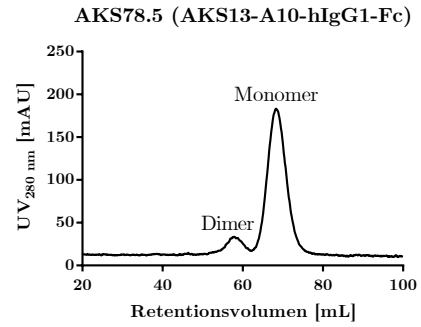
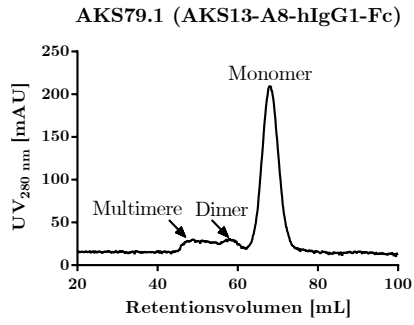
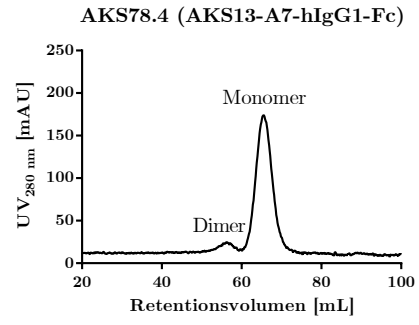
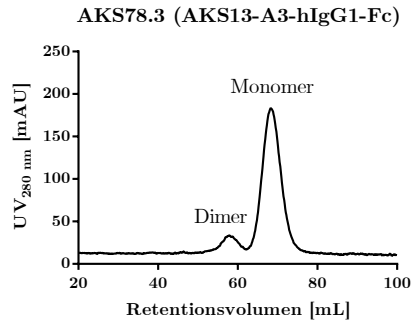
Die Bildung von Dimeren und Multimeren kann einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften von Antikörpern haben. Liegen Antikörper zum Beispiel in Aggregaten vor, kann dies zu Aviditätseffekten und dadurch zu einer höheren apparenten Affinität führen, da mehrere Bindungsstellen vorhanden sind. Um die Ergebnisse aus ELISA und Immunfärbung zu validieren, wurden die scFv-Fc-Antikörper deswegen mittels Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) analysiert.

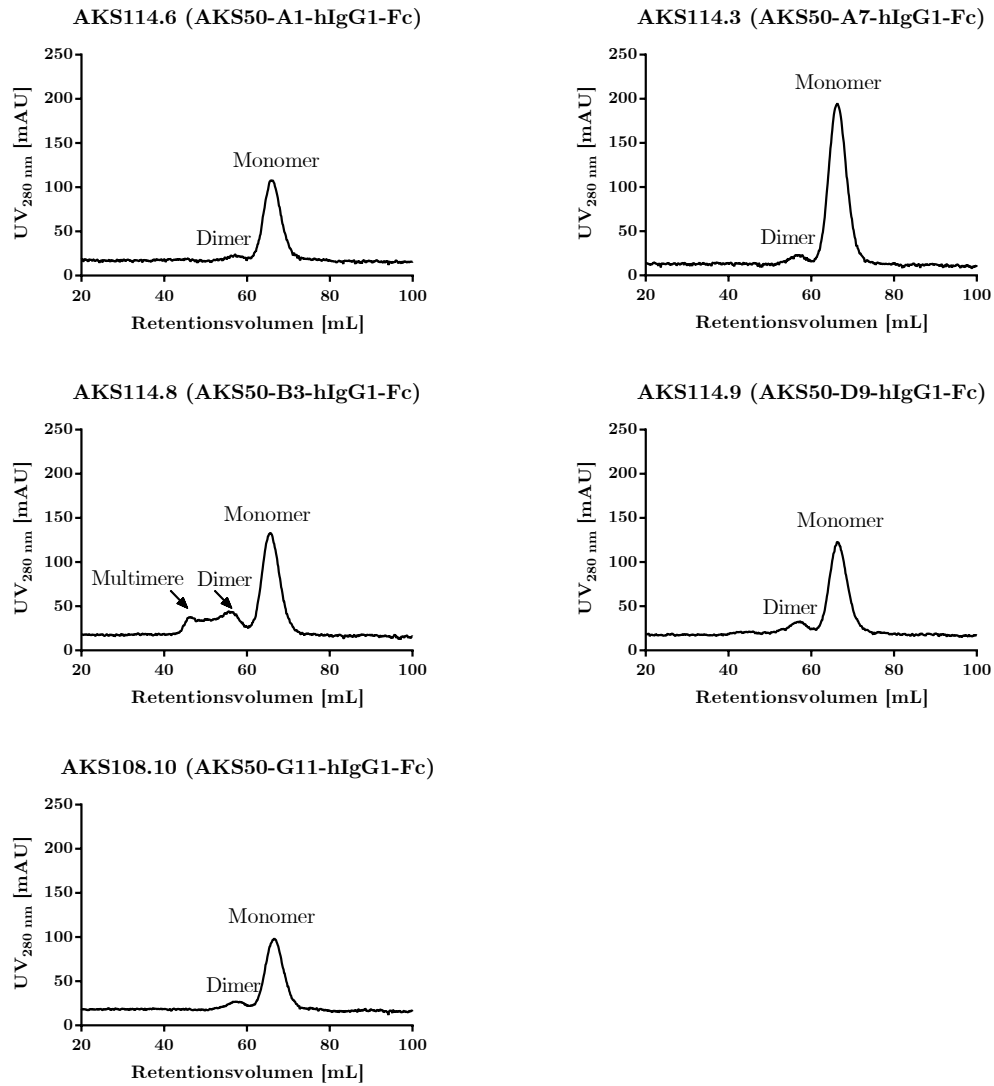
#### 4 Ergebnisse

Diese Methode ermöglicht die Trennung von Proteinen nach Größe und Konformation und das fraktionierte Auffangen nach definierten Kriterien. Für eine präparative Auftrennung konnten nur scFv-Fc-Antikörper eingesetzt werden, die eine ausreichend hohe Konzentration aufwiesen, um ein ausreichend hohes Signal in der SEC zu erhalten.

Bei allen untersuchten scFv-Fc-Antikörpern konnte die Bildung von Dimeren und Multimeren nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.3). Die Monomerfraktionen wurden aus diesem Grund isoliert und direkt für die Analyse der Antigenbindung verwendet.

## 4 Ergebnisse





**Abbildung 4.3:** Präparative SEC der scFv-Fc-Antikörper

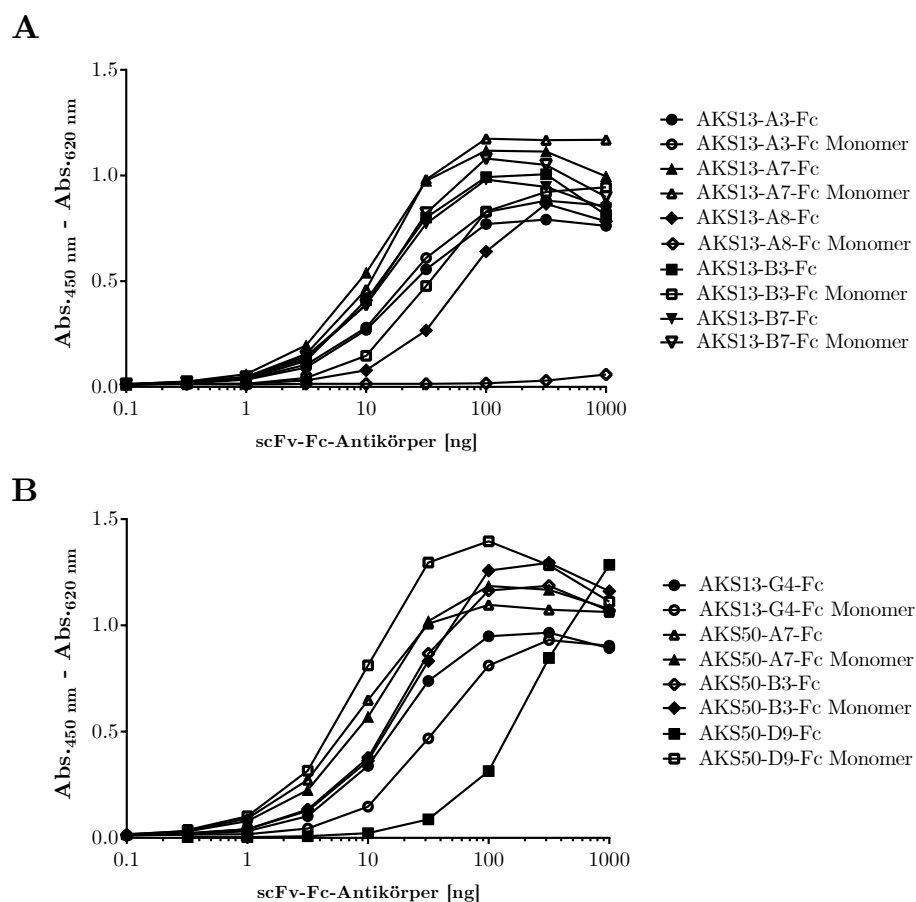
Präparative Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der Dimer- und Multimerbildung der scFv-Fc-Antikörper. Als Laufpuffer wurde PBS benutzt. Es wurde die Säule Superdex 200 HiLoad 16/60 mit einer Flussrate von 0,3 mL/min eingesetzt. In den Chromatogrammen ist die Absorption bei 280 nm in Bezug zu der Retentionszeit der scFv-Fc-Antikörper dargestellt. Monomer-, Dimer- und Multimerfraktion sind als solche gekennzeichnet. Die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts erfolgte durch eine Kalibriergerade von Proteinen bekannter Größe (nicht gezeigt).

#### 4.1.6 Charakterisierung der scFv-Fc-Antikörper in ELISA und Immunfärbung

Die gereinigten scFv-Fc-Antikörper und ihre Monomerfraktionen wurden hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften im Titrations-ELISA als auch in der Immunfärbung getestet. Damit lassen sich Aussagen über Bindungsstärke und Kreuzreaktivität treffen, die bei der Wahl des Antikörpers in verschiedenen Test von Bedeutung sind. So werden für die Arbeit mit oberflächenpräsentierenden *E. coli*-Zellen (siehe Abschnitt 4.3) Antikörper benötigt, die eine hohe Bindungsstärke aufweisen und keine Kreuzreaktivität auf *E. coli*-eigenen Proteinen zeigen.

Im Titrations-ELISA mit definierten Antikörpermengen konnte die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) der scFv-Fc-Antikörper verglichen werden (siehe Abbildung 4.4). Alle gereinigten scFv-Fc-Antikörper (Gesamtprotein) binden im ELISA spezifisch an BMX und zeigen keine Reaktion mit BSA. Die niedrigste  $EC_{50}$  zeigt der scFv-Fc-Antikörper AKS50-A7 mit 11 ng, die höchste AKS13-A8 mit 50 ng. Das Bindungsverhalten der scFv-Fc-Antikörper der Monomerfraktion ändert sich im Vergleich zur Gesamtprobe nur für die zwei scFv-Fc-Antikörper AKS13-A8 und AKS50-D9, deren  $EC_{50}$  für die Monomere stark gesunken ist (AKS50-D9 Monomerfraktion 8 ng, Gesamtprotein 102 ng) bzw. deren Monomerfraktion keine Bindung mehr an das Antigen zeigt (AKS13-A8). Die Monomerfraktionen der anderen scFv-Fc-Antikörper zeigen ein ähnliches Bindeverhalten im ELISA wie das Gesamtprotein, sodass der Einfluss der Aggregation auf die Bindungseigenschaften vernachlässigbar ist.



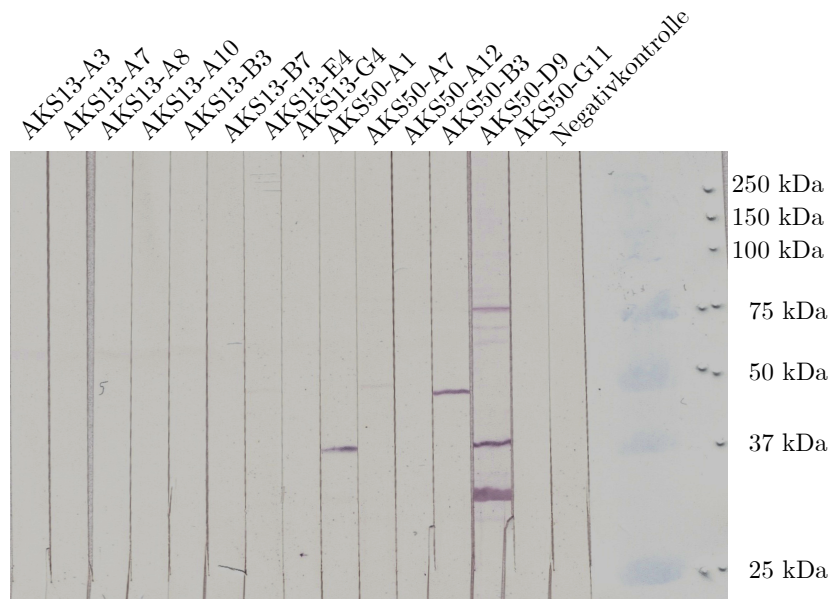


**Abbildung 4.4:** Titrations-ELISA der scFv-Fc-Antikörper und ihrer Monomerfraktionen

(A-B) Die gereinigten scFv-Fc-Antikörper und ihre durch präparative SEC gewonnenen Monomerfraktionen wurden im Titrations-ELISA auf 200 ng BMX in Mikrotiterplatten analysiert. Als Negativkontrolle dienten mit BSA beschichtete Wells, die bei allen scFv-Fc-Antikörpern zu Signalen kleiner als 0,1 führten (nicht gezeigt). Als Nachweisantikörper wurde ein  $\alpha$ -hIgG-HRP-Antikörper eingesetzt (Sigma A0170).

Für den Einsatz der scFv-Fc-Antikörper bei der Entwicklung eines Systems zum Oberflächendisplay auf *E. coli* (siehe Abschnitt 4.3) wurden sie auf Kreuzreaktivität mit *E. coli*-Proteinen überprüft. Von den 14 produzierten scFv-Fc-Antikörpern zeigten AKS50-A1, AKS50-B3 und AKS50-D9 Kreuzreaktivität auf *E. coli*-Gesamtzelllysat. Die verbleibenden 11 scFv-Antikörper konnten für den Nachweis von Anti-

genen auf der äußeren Membran von *E. coli* eingesetzt werden (siehe Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5:** Bindung der scFv-Fc-Antikörper auf *E. coli* Zelllysaten

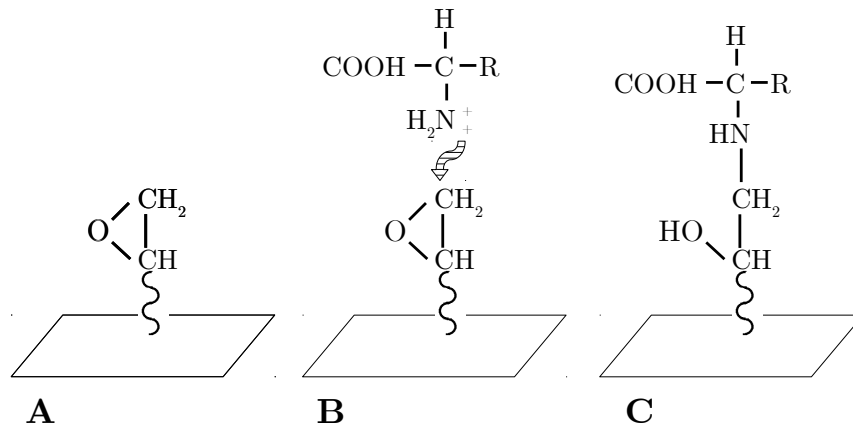
Gesamtzelllysate von *E. coli* TOP10 wurden auf einem 10 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Einzelne Streifen wurden mit den scFv-Fc-Antikörpern inkubiert und die Bindung mit einem  $\alpha$ -hIgG-AP-Antikörper (Dianova 109-055-098) und NBT/BCIP-Färbung nachgewiesen. Negativkontrolle: nur Sekundärantikörper.

### 4.2 Panning auf Microarrays

Im Folgenden wurde die Realisierbarkeit von Panning auf einem Microarray analysiert. Mit dieser Technologie, die bereits breite Anwendung in der Bestimmung von Protein-Protein-Wechselwirkungen hat, können mehrere Vorteile gegenüber dem bereits vorgestellten Panning in Mikrotiterplatten erreicht werden. So reichen minimale Antigenmengen aus, die vollautomatisch auf die Trägeroberfläche gedruckt werden können. Auch die Anzahl der parallel abzuarbeitenden Antigene erhöht sich drastisch, da keine Limitierung wie durch die Zahl der Mikrotiterplatten-Wellen erreicht wird. Ein weiterer Vorteil ist die Reduktion der scFv-Phagenbibliothek, da alle Antigene parallel mit dieser inkubiert werden. Dies hat vermutlich auch Auswirkungen

auf die Abreicherung unspezifisch bindender scFv-Phagen, sodass auch Kreuzreaktivitäten vermindert werden könnten.

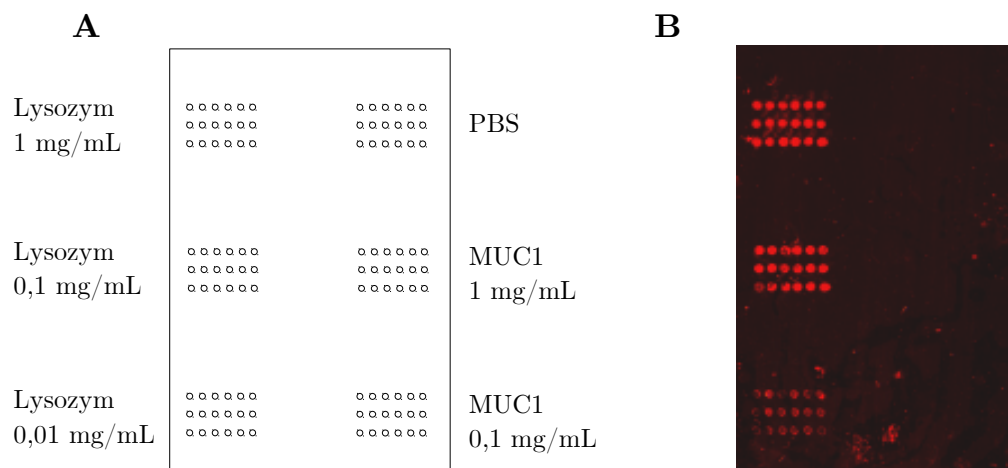
Nach dem erfolgreichen Panning auf Polystyroloberflächen wurden zunächst vergleichende Tests zur Antigenbindung an Glas- und Polystyroloberflächen und zur Antigenlimitierung bezüglich Konzentration und Fläche durchgeführt. Dafür wurden die Epoxysilan-beschichteten Glaträger Nexterion SlideE der Firma Schott (Tempe, USA) mit den Standardmaßen 75,6 mm x 25,0 mm x 1,0 mm eingesetzt. Die Bindung von Proteinen auf der Oberfläche basiert auf der Reaktion der Epoxysilanbeschichtung mit nukleophilen Gruppen (NH<sub>2</sub>-, SH- und OH-Gruppen) in den Seitenketten der Aminosäuren [Schott, 2009]. Die Reaktion läuft spontan und irreversibel ab und bildet kovalente Bindungen zwischen Protein und Oberfläche aus (siehe Abbildung 4.6). Ein Glaträger mit immobilisiertem Protein wird als Protein-Microarray oder kurz Microarray bezeichnet.



**Abbildung 4.6:** Schematische Darstellung der Protein-Epoxybindung  
 Nexterion SlideE Glaträger sind mit Epoxysilan beschichtet (**A**), das mit nukleophilen Gruppen in den Seitenketten von Aminosäuren reagiert (**B**) und eine kovalente Epoxybindung bildet (**C**).

### 4.2.1 Nachweis der Antigenbindung auf Microarrays

Zunächst wurde überprüft, ob die Antigene Lysozym und MUC1 kovalent auf dem Nexterion SlideE Glasträger gebunden werden können. Dafür wurden die Antigene mittels dem manuellen Spot-Druckers Microcaster (GE Healthcare, München) auf den Microarray gedruckt [Schott, 2009] und mit 3% Milchpulver in PBST über Nacht geblockt. Als Negativkontrolle wurde PBS ohne Antigen auf den Glasträger gedruckt. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 mL PBST im 50 mL-Schraubröhrchen wurden die Arrays mit dem  $\alpha$ -Lysozym-Antikörper DM321-F11-hIgG1-Fc inkubiert und erneut gewaschen. Mit einem Cy3-konjugierten  $\alpha$ -human-IgG1-Fc-spezifischen Sekundärantikörper konnte die Bindung des scFv-Fc-Antikörpers nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass das Antigen an den Glasträger gebunden ist und die Konformation nicht insofern verändert wurde, dass das Epitop nicht mehr vom scFv-Fc-Antikörper erkannt wird (siehe Abbildung 4.7).



**Abbildung 4.7:** Schematische Darstellung des Spotmusters und Bild des Microarray-Scans

Ein Nexterion SlideE Glasträger wurde mithilfe des manuellen Spot-Druckers Microcaster (GE Healthcare, München) gemäß dem Schema (**A**) mit Lysozym, MUC1 und PBS bedruckt. Nach Blocken der restlichen reaktiven Oberfläche wurde der Microarray mit einem  $\alpha$ -Lysozym-scFv-Fc-Antikörper inkubiert und die spezifische Bindung durch den  $\alpha$ -human-IgG-Cy3 Antikörper im Arrayreader GenePix 4100A (Molecular Devices, Sunnyvale (USA)) nachgewiesen (**B**).

Es konnte gezeigt werden, dass Lysozym an den Array gebunden ist und das Abreaktieren der freien Bindestellen mit 3 % Milchpulver in PBST zu einem guten Signal-Hintergrund-Verhältnis führt. Der Nachweis über den jeweils Antigen-spezifischen Antikörper führt zu keinem Signal auf PBS und auch der Sekundärantikörper allein bindet nicht unspezifisch. Das gleiche Resultat konnte auch für MUC1 erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Auch die Stabilität der Bindung des Antigens an den Glasträger wurde analysiert, da die Waschbedingungen während eines Pannings zur Reduktion unspezifisch gebundener Phagen intensiv sind. Dazu wurde der Microarray nach dem Spotten und Inkubation über Nacht 10x bis 30x im ELISA-Washer gewaschen, wie es auch beim Panning in Mikrotiterplatten durchgeführt wird. Der Microarray wurde dafür zuvor mit einem Inkubationsgitter versehen, das auf dem Microarray 16 Kavitäten erstellt. Auf diese Weise ist es möglich, mehrere Analysen parallel auf einem Glasträger durchzuführen. Der Microarray und das Inkubationsgitter wurden anschließend geblockt und wiederum mit den Antigen-spezifischen Primärantikörpern und dem Cy3-markierten Sekundärantikörper inkubiert.

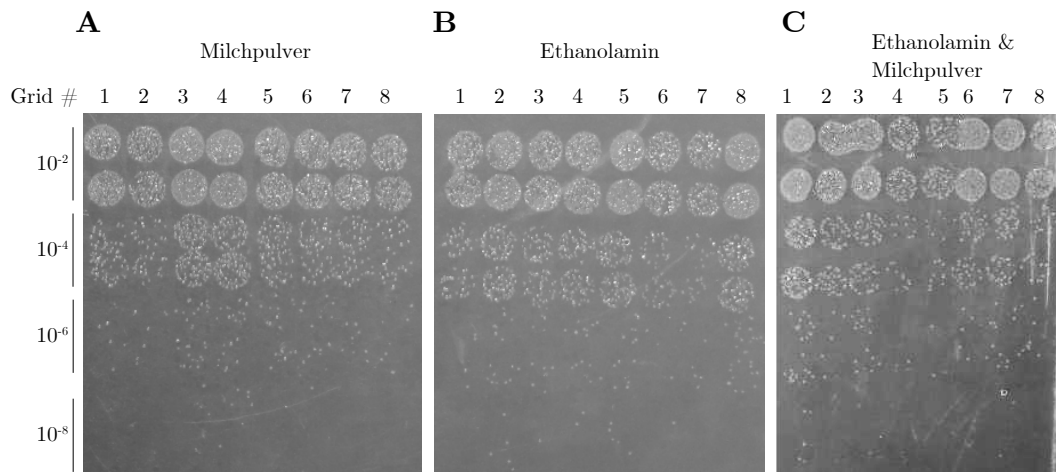
Die Auswertung der Signale ergab, dass die kovalente Epoxybindung durch das verstärkte Waschen nicht beeinträchtigt wurde, da keine Reduktion der Signalstärke im Vergleich zu Abbildung 4.7 auftrat. Eine konzentrationsabhängige Bindung von scFv-Fc-Antikörpern ohne signifikante Hintergrundsignale diente deswegen als Grundlage für die weiterführenden Experimente mit scFv-Phagen.

### 4.2.2 scFv-Phagenbindung auf Microarrays

Nach der erfolgreichen Immobilisierung der Antigene wurden die Versuche mit scFv-Phagen fortgeführt, um die Bedingungen der Panningprozedur anzugleichen. Phagen neigen vermehrt zu unspezifischen Bindungen (*stickiness*), die durch die pIII-Fusion mit einem scFv noch verstärkt wird. Zunächst wurde deshalb überprüft, welcher An-

teil der Phagen unspezifisch an den Microarray bzw. das Inkubationsgitter bindet und welche Blockinreagenzien die unspezifische Bindung von scFv-Phagen an den Microarray reduzieren.

Zu diesem Zweck wurden Epoxysilan-beschichteten Glasträger Nexterion SlideE ohne gedrucktes Antigen mit einem Inkubationsgitter versehen, die Wells geblockt, mit scFv-Phagenbibliothek inkubiert und 30x im ELISA-Washer gewaschen. Nach der Elution wurden die Zahl der eluierten Phagen bestimmt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Blockingeffizienz zwischen Milchpulver, Ethanolamin und einem Milchpulver-Ethanolamin-Gemisch festgestellt werden. Allerdings trat reproduzierbar eine positionsabhängige Differenz von bis zu zwei Zehnerpotenzen auf, die aus ungleichmäßigem Waschen des ELISA-Washers resultierte und technisch nicht behoben werden konnte (siehe Abbildung 4.8).



**Abbildung 4.8:** Analyse verschiedener Blockingreagenzien für Microarrays

Freie Bindungsstellen auf dem Epoxysilan-beschichteten müssen durch ein geeignetes Blockingreagenz abreagiert werden. Neben dem empfohlenen Reagenz Milchpulver in PBST (**A**) wurden Ethanolamin (**B**) und ein Milchpulver-Ethanolamin-Gemisch (**C**) in jeweils 8 Microarray-Wells parallel getestet. Nach 30x Waschen wurden die Phagen eluiert, *E. coli* XL1 Blue MRF<sup>+</sup>-Zellen infiziert und als Duplikat in einer Verdünnungsreihe ausgetropft (10<sup>-2</sup> bis 10<sup>-8</sup>).

### 4.2.3 Panning auf Microarrays

Das Ziel der beschriebenen Versuche zum Microarray ist das Panning im Hochdurchsatz. Während beim Panning in Mikrotiterplatten bis zu 5 µg Antigen immobilisiert werden auf einer Fläche von fast 100 mm<sup>2</sup>, ist die Antigenmenge auf einem Microarray auf wenige Nanogramm und eine Fläche von weniger als 0,2 mm<sup>2</sup> reduziert. Es muss deswegen sichergestellt werden, dass die eingesetzte Menge Antigen auch auf einem Microarray zu einer Anreicherung spezifisch bindender scFv-Phagen führt.

Um die mindestens benötigte Antigenmenge für ein Panning zu definieren, wurden Spots manuell mit dem Arraydrucker in die Wells einer Mikrotiterplatte und auf einen Nexterion SlideE gedruckt (siehe Abbildung 4.7) und ein Panning mit den scFv-Phagenbibliotheken HAL9 und HAL10 durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden sowohl in einem Well der Mikrotiterplatte als auch in einer Kavität des Inkubationsgitters auf dem Microarray 5 µg Lysozym in 100 µL PBS immobilisiert, da auf dieser Antigenmenge nachweislich bereits spezifische Antikörper generiert werden konnten. Nach der dritten Panningrunde wurden jeweils 92 Klone selektiert und lösliche scFvs produziert. Diese wurden im Screening-ELISA in Mikrotiterplatten auf 200 ng Lysozym pro Well eingesetzt.

Das Panning in Mikrotiterplatten führte sowohl bei der Immobilisierung von 5 µg in 100 µL als auch bei der Immobilisierung von Spots zur Selektion von spezifischen Bindern. Im Gegensatz dazu konnten bei dem Panning auf den Microarrays auch bei der großflächigen Immobilisierung mit 5 µg in 100 µL Volumen keine spezifischen Binder selektiert werden (siehe Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.5:** Ergebnisse des Screening-ELISAs für das Panning auf Antigen-Spots

<b>Immobilisierung</b>	<b>Antigen- menge</b>	<b>Fläche</b>	<b>positive Signale im Screening-ELISA</b>
Polystyrol MTP	2 spots	0,4 mm <sup>2</sup>	0
Polystyrol MTP	4 spots	0,8 mm <sup>2</sup>	0
Polystyrol MTP	8 spots	1,6 mm <sup>2</sup>	0
Polystyrol MTP	16 spots	3,2 mm <sup>2</sup>	1
Polystyrol MTP	32 spots	6,4 mm <sup>2</sup>	21
Polystyrol MTP	5 µg/100 µL	95 mm <sup>2</sup>	37
Nexterion SlideE	2 spots	0,4 mm <sup>2</sup>	0
Nexterion SlideE	4 spots	0,8 mm <sup>2</sup>	0
Nexterion SlideE	8 spots	1,6 mm <sup>2</sup>	0
Nexterion SlideE	16 spots	3,2 mm <sup>2</sup>	0
Nexterion SlideE	32 spots	6,4 mm <sup>2</sup>	0
Nexterion SlideE	5 µg/100 µL	49 mm <sup>2</sup>	0

Es konnte gezeigt werden, dass die Antigenmenge für ein Panning in Mikrotiterplatten um ein Vielfaches reduzierbar ist. Dabei wurde eine flächenbezogene Grenze des benötigten Antigens bei einer Immobilierungsfläche kleiner als 3,2 mm<sup>2</sup> erreicht, bei der nur noch einer von 92 getesteten scFvs nach der dritten Panningrunde eine spezifische Bindung aufwies. Im Gegensatz dazu konnte auf den Microarrays kein spezifischer scFv generiert werden. Dies bestätigt die zuvor durchgeführten Experimente zum Bindeverhalten von scFv-Phagen auf dem epoxysilanbeschichteten Objektträger. Es ist mit den eingesetzten Immobilisierungs-, Blocking- und Panningbedingungen nicht möglich, auf einem Microarray spezifische Binder gegen Lysozym aus einer scFv-Phagenbibliothek zu selektieren.

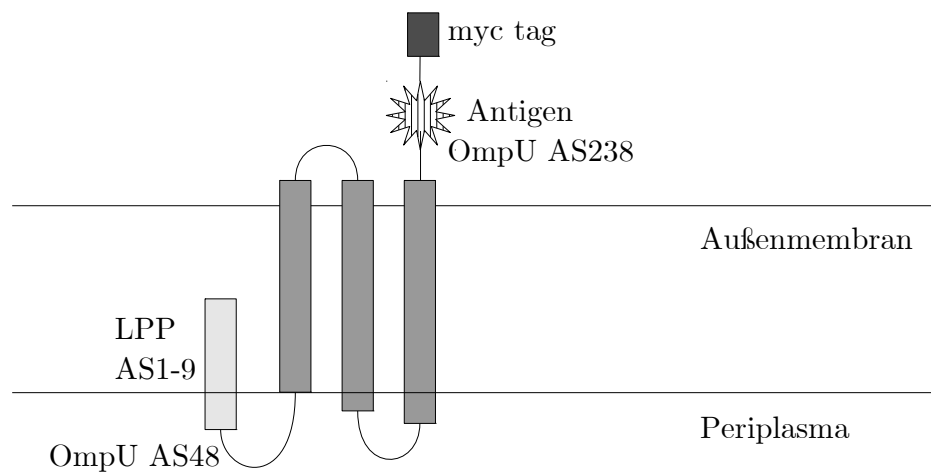


### 4.3 Oberflächenpräsentation von Antigenen auf *E. coli*

Als weitere Möglichkeit eines Pannings im Hochdurchsatz wurde die Oberflächenpräsentation von Antigenen auf *E. coli* analysiert. Dabei wird das Antigen nicht separat produziert und auf Trägermaterial immobilisiert, sondern das Antigen direkt auf der *E. coli*-Zelle präsentiert. Dies reduziert nicht nur den bisherigen Reinigungsaufwand für Antigene über tags, sondern ermöglicht auch das Panning auf nativ gefalteten Antigenen, die nicht durch Immobilisierung verändert wurden. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die schnelle Identifizierung von Bindungspartnern, da diese Methode die Kopplung von Antigen- und Antikörper-Gen innerhalb einer Zelle ermöglichen kann.

#### 4.3.1 Konstruktion eines Plasmids für die Oberflächenpräsentation auf *E. coli*

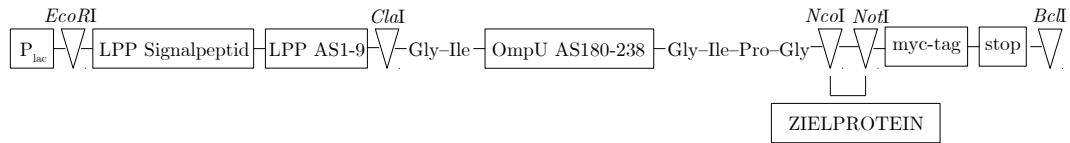
Für die Präsentation von Antigenen auf *E. coli*-Zellen wurde ein Transporterprotein gewählt, dessen Nutzung im Oberflächendisplay bereits publiziert wurde: OmpU [Yang et al., 2008]. Bei OmpU handelt es sich um ein Außenmembranprotein des Marinebakteriums *Vibrio anguillarum*. Die Transportersequenz wurde in das Plasmid pUC18 integriert, sodass das Zielantigen C-terminal fusioniert werden kann. Die Signalsequenz und die ersten neun Aminosäuren des *E. coli* Lipoproteins (LPP) führen das Protein dabei an die Innenseite der Außenmembran, wo es durch die Transmembranregionen von OmpU durch die Außenmembran auf der Zelloberfläche präsentiert wird (siehe Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9:** Schematische Darstellung der Oberflächenpräsentation (modifiziert nach [Yang et al., 2008])

Die Signalsequenz und die ersten neun Aminosäuren des *E. coli* Lipoproteins (LPP) führen das Protein an die Innenseite der Außenmembran. Das Protein und OmpU bildet  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen innerhalb der äußeren Membran von *E. coli* aus und ermöglichen die Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche. Der myc-tag dient dem Nachweis der vollständigen Präsentation des Antigens. AS: Aminosäure.

Für die Konstruktion des entsprechenden Plasmids wurde pU18 eingesetzt, das über eine Ampicillinresistenz, einen induzierbaren lacZ-Promoter und einen modifizierten Replikationsursprung verfügt. Die hohe Kopienzahl pro Zelle ermöglicht dabei eine hohe Transkriptionsrate. Das Gensegment von OmpU wurde durch mehrere PCR-Amplifikationen mit überlappenden Oligonukleotiden generiert und über die Schnittstellen *Cla*I und *Nco*I eingefügt. Die Integration der Zielsequenz erfolgte in die Klonierungsstelle zwischen *Nco*I und *Not*I. Das Gesamtgenkonstrukt für die Außenmembranpräsentation wurde über die Schnittstellen *Eco*RI und *Bcl*I in pUC18 eingefügt (siehe Abbildung 4.10).



**Abbildung 4.10:** Genkarten des Transporters OmpU in pUC18

Das Zielantigen wird durch das Transporterprotein OmpU im pUC18-Plasmid auf der äußeren Membran von *E. coli* präsentiert. LPP-Signalpeptid: Gen für das Lipoprotein-Signalpeptid; P<sub>lacZ</sub>: induzierbarer lacZ-Promotor; OmpU: Genabschnitt von *outer membrane protein* U; *EcoRI*/*ClaI*/*BclI*: Klonierungsstellen Transporter; *NcoI*/*NotI*: Klonierungsstellen für Zielprotein.

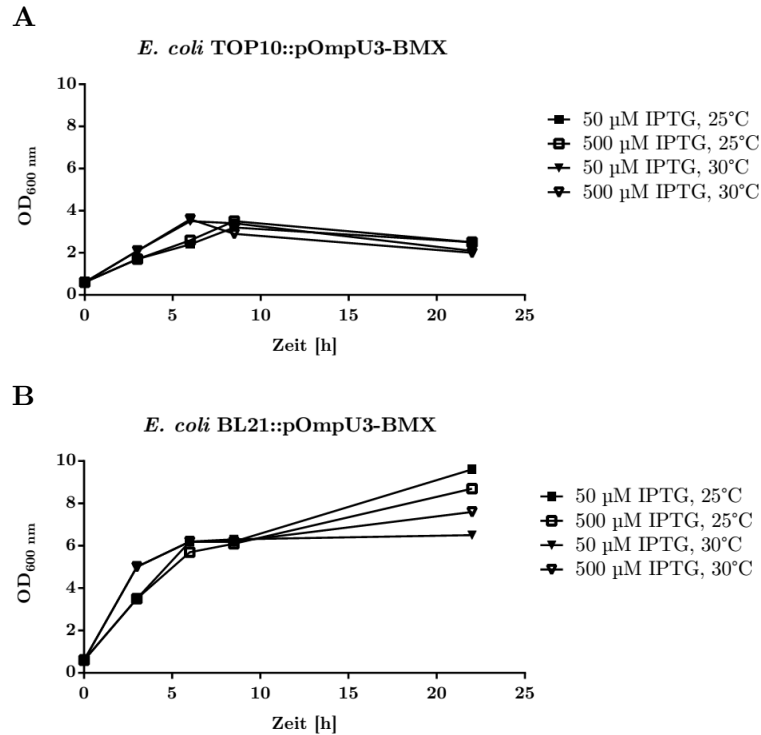
### 4.3.2 Oberflächenpräsentation unter verschiedenen Bedingungen

Für die Oberflächenpräsentation wurde das Konstrukte pOmpU3-myc mit den Genen für BMX in die *E. coli*-Stämme TOP10 und BL21 transformiert. Anhand dieser Kombinationen wurden die Temperatur als Wachstumsparameter, die IPTG-Konzentration als Induktionsparameter und die Inkubationsdauer als Expressionsparameter analysiert (siehe Tabelle 4.6).

**Tabelle 4.6:** Ansätze zur Wachstums- und Expressionsanalyse

<i>E. coli</i> -Stamm	Display-Plasmid	Antigen	erwartete Größe
BL21	pOmpU3-myc	BMX	29 kDa
TOP10	pOmpU3-myc	BMX	29 kDa

Das Wachstumsverhalten ist stark abhängig vom *E. coli*-Stamm, dafür aber weitgehend unabhängig von der Temperatur (25 °C oder 30 °C) und der IPTG-Konzentration (50 µM IPTG oder 500 µM IPTG). Die *E. coli*-BL21-Zellen zeigen im Vergleich zu den TOP10-Zellen eine höhere Wachstumsrate und maximale Zelldichte und sind auch nach der Kultivierung über Nacht im Gegenteil zu den TOP10-Zellen noch nicht in der Absterbephase (siehe Abbildung 4.11).



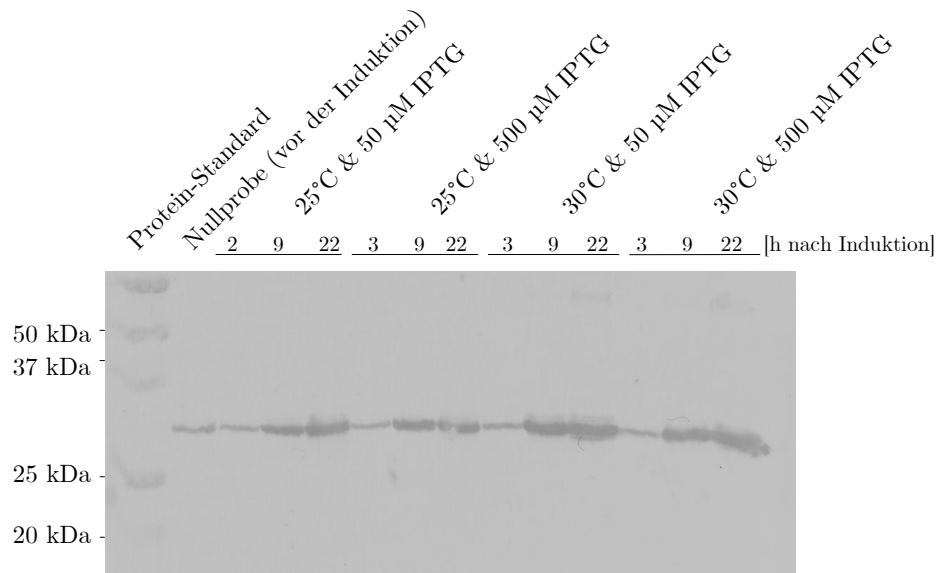
**Abbildung 4.11:** Wachstumskurven von oberflächenpräsentierenden *E. coli*

Das Plasmid pOmpU3-BMX wurde in die *E. coli*-Stämme TOP10 (**A**) und BL21 (**B**) transformiert und das Wachstum anhand der optischen Dichte der Kultur gemessen. Der Beginn der Messung bei 0 Stunden ist dabei der Zeitpunkt der IPTG-Zugabe und der Temperaturänderung.

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten kann ein Hinweis auf die Expression der Fusionsproteine sein. Ausgehend von den gemessenen Zelldichten wurden die Zellen deswegen auf die gleichen Werte eingestellt und unter reduzierenden Bedingungen per SDS-PAGE aufgetrennt. In der Immunfärbung wurde über den myc-Tag des Fusionsproteins dessen Produktion nachgewiesen werden. Das Gesamtzelllysate gibt darüber Auskunft, ob das Zielantigen grundsätzlich produziert wurde. Bei der Kultivierung von BL21-Zellen konnte in keiner der Proben die Produktion des Fusionsproteins nachgewiesen werden. Dies erklärt die stark erhöhte Wachstumsrate gegenüber den TOP10-Zellen, da keine Ressourcen für die Expression des Oberflächenproteins aufgewendet werden mussten. Die Expression des BMX-Fusionsproteins in TOP10-

#### 4 Ergebnisse

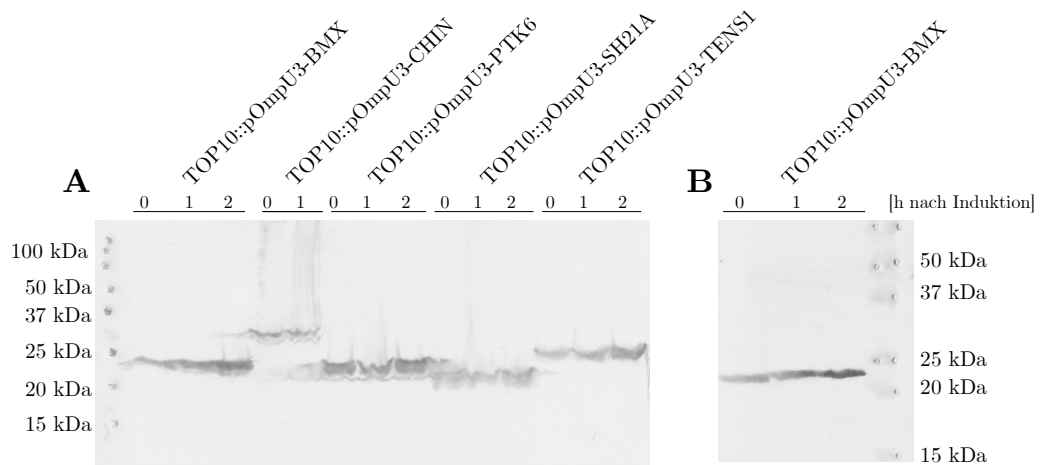
Zellen konnte dagegen unter allen Kultivierungsbedingungen im Gesamtzelllysat nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.12).



**Abbildung 4.12:** Immunfärbung der Gesamtzelllysate

Während der Kultivierung von *E. coli* TOP10::pOmpU3-BMX wurden zum Zeitpunkt der Induktion (Nullprobe) und 3, 6, 8,5 und 22 Stunden nach der Induktion Proben genommen. Diese wurden auf die gleiche  $OD_{600nm}$  normiert und unter reduzierenden Bedingungen per SDS-PAGE aufgetrennt. In der Immunfärbung wurde der myc-tag des Zielproteins über die Antikörper 9E10 und Ziege  $\alpha$ -Maus IgG-AP (Sigma-Aldrich A2429) nachgewiesen. Die erwartete Größe des Zielproteins beträgt 29 kDa.

Die Expression der Zielantigene konnte auch für weitere pOmpU3-Konstrukte im Gesamtzelllysat gezeigt werden (siehe Abbildung 4.13).



**Abbildung 4.13:** Immunfärbung der Gesamtzelllysate verschiedener Ansätze zur Oberflächenpräsentation

Bei den mithilfe des Plasmids pOmpU3 in *E. coli* TOP10-Zellen produzierten Antigenen handelt es sich um Domänen von BMX mit dem erwarteten Molekulargewicht von 23 kDa, von CHIN mit 29 kDa, von PTK6 mit 24 kDa, von SH21A mit 22 kDa und von TENS2 mit 25 kDa. Der Nachweis erfolgte über den universellen myc-Tag (A) oder über einen Antigen-spezifischen Antikörper (B).

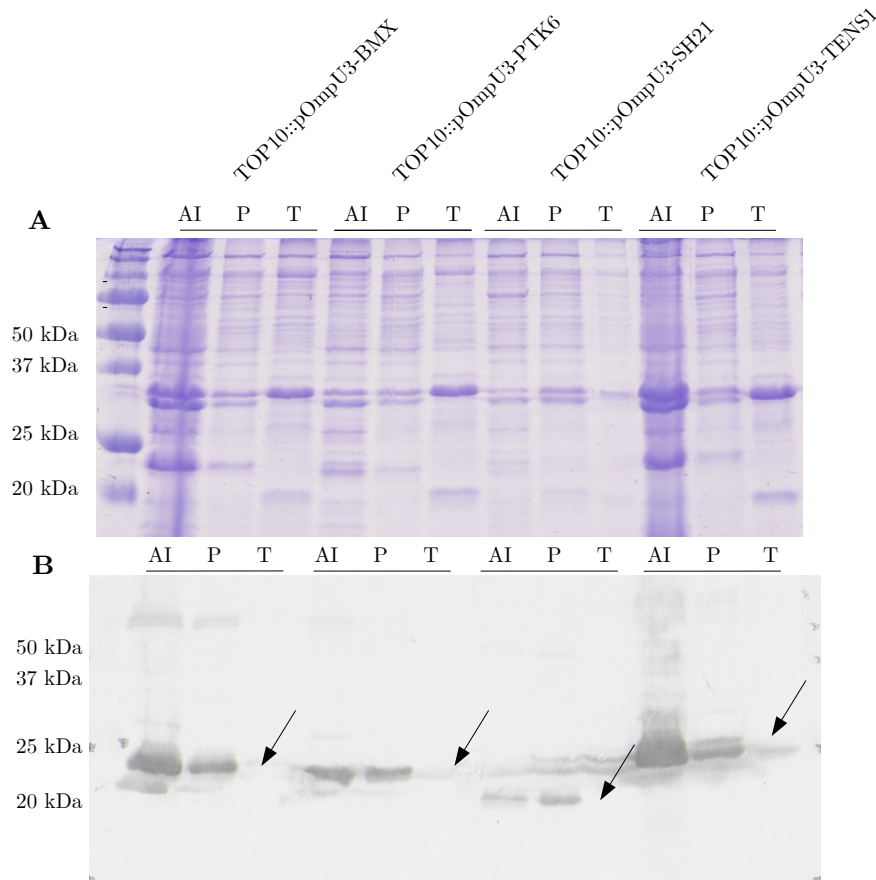
### 4.3.3 Außenmembranisolation

Um die Lokalisierung der Fusionproteine zu überprüfen, wurden die einzelnen Kompartimente der Bakterienzelle voneinander getrennt und die Außenmembranproteine nach einem modifizierten Protokoll von Hantke [Hantke, 1981] angereichert. Zusätzlich wurde die Präsentation auf der Oberfläche durch die Zugänglichkeit für extrazelluläre Proteasen bestimmt. Die Proteasen Trypsin und Proteinase K sind zum Beispiel zu groß, um über die äußere Membran in das Periplasma von *E. coli* zu gelangen. Auf diese Weise können nur Proteine verdaut werden, die sich an der Zelloberfläche befinden.

Zu je einem Ansatz wurden Proteinase K und Trypsin gegeben, ein Ansatz wurde nicht mit Proteasen behandelt. Von den so behandelten Zellen wurde ein Außenmembranisolat hergestellt, das unter reduzierenden Bedingungen per SDS-PAGE

## 4 Ergebnisse

aufgetrennt und in einer Immunfärbung analysiert wurde (siehe Abbildung 4.14).



**Abbildung 4.14:** Coomassie-Färbung/Immunfärbung der *E. coli*-Außenmembranisolate

Die Domänen der Antigene BMX, PTK6, SH21 und TENS1 wurden mithilfe des Plasmids pOmpU3 in *E. coli* TOP10 Zellen produziert. Aus den Kulturen wurden 2 Stunden nach Induktion mit 50  $\mu$ M IPTG entweder ohne Proteasebehandlung Außenmembranisolate (**AI**) hergestellt, oder vor der Außenmembranisolation Proteinase K (**P**) bzw. Trypsin (**T**) hinzugegeben. Im Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gel (**A**) sind alle Proteine der Außenmembranisolate angefärbt, während in der Immunfärbung (**B**) die Antigene über den myc-Tag nachgewiesen wurden. Die fehlende Bande nach Trypsinbehandlung ist mit einem Pfeil markiert.

Die Immunfärbung der Außenmembranisolate bestätigt die Präsentation von BMX auf der Außenmembran von *E. coli*. Da im Außenmembranisolat das Antigen detektierbar ist, im zuvor mit Protease behandeltem Außenmembranisolat dagegen

nicht, kann man auf die Antigenpräsentation auf der Außenseite der Außenmembran schließen. Während das Ergebnis für Proteinase K keine eindeutige Aussage über die Orientierung zulässt, da nur eine schwache Reduktion der Bandenintensität auftritt, kann nach Verdau mit Trypsin kein Antigen mehr nachgewiesen werden. Dies ist ein indirekter Nachweis für die Präsentation von BMX auf der Oberfläche von *E. coli*.

### 4.3.4 Anwendung des Oberflächendisplays

Neben der Anwendung des Oberflächendisplays als Ersatz für gereinigte rekombinant hergestellte Antigene, eröffnet es auch die Möglichkeit einer neuen Panningmethode, die auf der Kombination der genetischen Information des Antigens und der des scFv-Antikörpers basiert. Im Phagen-Panning werden *E. coli*-Stämme eingesetzt, die F-Pili ausbilden. Die vom immobilisierten Antigen eluierten Phagen mit der genetischen Information für einen scFv können diese Zellen infizieren. Dafür bindet der Phage an den F-Pilus und wird mit diesem in die äußere Zellmembran gezogen, wo die genetische Information des Phagen in die Zelle transferiert wird. Die *E. coli*-Zelle verfügt dann über die genetische Information des scFvs. Dabei erfolgt die Infektion ungerichtet, d.h. der eluierte Phagen infiziert keine spezifische Zelle. Dies könnte sich durch den Einsatz von *E. coli*-Zellen ändern, auf deren Oberfläche ein Antigen präsentiert wird. Es wurde deswegen untersucht, wie sich das Oberflächendisplay auf die Infektion durch Phagen auswirkt.

Für die Infektionstests wurden zwei *E. coli*-Stämme eingesetzt, die sich nur in ihrer Fähigkeit, F-Pili auszubilden unterscheiden: TOP10 und TOP10F'. Beide Stämme wurden sowohl mit dem Konstrukt pOmpU3-BMX als auch pOmpU3-CHIN kultiviert. Nach Überprüfung der Antigenpräsentation wurden die Zellen mit den anti-BMX-spezifischen scFv-Phagen oder anti-MUC1-spezifischen scFv-Phagen als Kontrolle inkubiert (siehe Tabelle 4.7).

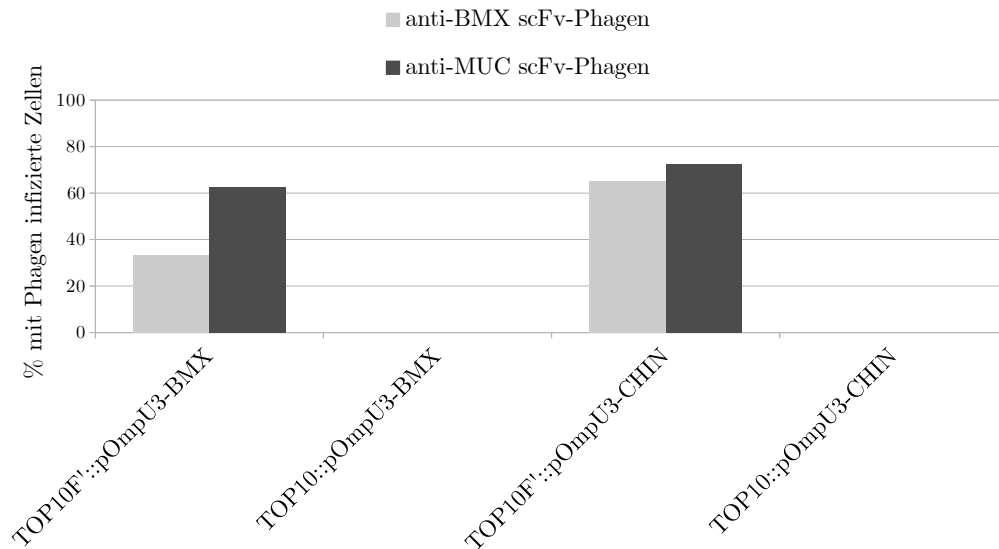


**Tabelle 4.7:** Phageninfektion von Antigen-präsentierenden *E. coli*

<i>E. coli</i> -Stamm	Display-Plasmid	scFv-Phagen
TOP10	pOmpU3-BMX	$\alpha$ -BMX
TOP10	pOmpU3-BMX	$\alpha$ -MUC1
TOP10	pOmpU3-CHIN	$\alpha$ -BMX
TOP10	pOmpU3-CHIN	$\alpha$ -MUC1
TOP10F'	pOmpU3-BMX	$\alpha$ -BMX
TOP10F'	pOmpU3-BMX	$\alpha$ -MUC1
TOP10F'	pOmpU3-CHIN	$\alpha$ -BMX
TOP10F'	pOmpU3-CHIN	$\alpha$ -MUC1

Nach Waschen des Zellpellets wurden die Zellen ausplattiert. Da sowohl das Oberflächendisplay-Plasmid als auch das Phagendisplay-Plasmid eine Ampicillinresistenz tragen, kann die Infektion nicht durch antibiotische Selektion detektiert werden. Von 100 Kolonien pro Ansatz wurde aus diesem Grund die genetische Information per PCR bestimmt. Bei Zellen ohne F-Pilus konnten keine mit dem Phagemid infizierten Zellen nachgewiesen werden, Zellen mit F-Pilus dagegen wurden von den scFv-Phagen infiziert (siehe Abbildung 4.15).

## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.15:** Infektion oberflächenpräsentierender *E. coli*-Zellen

Die Zahl infizierter *E. coli*-Zellen mit (TOP10 F') und ohne F-Pilus (TOP10) durch spezifische und unspezifische scFv-Phagen wurde durch Kolonie-PCR bestimmt. Dabei wurden spezifische Oligonukleotide eingesetzt, die die Unterscheidung von Phagemid und Oberflächendisplay-Plasmid ermöglichen.

Die Infektion durch Bindung des spezifischen  $\alpha$ -BMX-scFv-Antikörper an das BMX auf der Oberfläche führt folglich nicht zu einer Infektion der Zellen über bloße lokale Nähe. Zellen mit F-Pilus dagegen wurden von den scFv-Phagen infiziert. Dabei ist die Infektionsrate deutlich geringer, wenn es bei der Inkubation zu einer spezifischen Antigen-Antikörper-Wechselwirkung an der Zelloberfläche kommt wie bei der Kombination von BMX-präsentierenden Zellen und  $\alpha$ -BMX spezifischen scFv-Phagen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Antikörpergenerierung

Die schnelle und zuverlässige Generierung von spezifischen Antikörpern zum Zwecke der Forschung, der Diagnostik oder der Therapie ist von besonderer Bedeutung. Auch für die Erforschung des Proteoms, der Gesamtheit aller Proteine eines Organismus, sind spezifische Antikörper unabdingbar. Nach Jahrzehnten der Antikörperproduktion durch Immunisierung und Hybridomtechnologie, hat sich für die Herausforderungen der Zukunft die *in vitro* Selektion durch das sogenannte Panning seit den 1990er Jahren etabliert. Zwar stammt die Mehrheit der bereits zugelassenen oder in der klinischen Phase befindlichen monoklonalen Antikörper aus der Hybridomtechnologie, doch ist es dafür notwendig, die Antikörper zu chimerisieren, zu humanisieren oder Mäuse mit humanem Immunsystem zu nutzen. Damit wird eine Immunantwort des menschlichen Körpers gegen die generierten Antikörper verhindert [Hwang & Foote, 2005].

Die Phagendisplay-Technologie ermöglicht dagegen durch Panning *in vitro* die Selektion vollständig humaner Antikörper. Der Verzicht auf Tierexperimente und die Möglichkeit, Antikörper gegen Toxine und Pathogene zu generieren sind weitere Vorteile dieser Methode. Auch können mittels Phagendisplay Affinitätsreifung und Stabilitätsreifung von Antikörpern durchgeführt [Thie et al., 2011] und die Bedingungen *in vitro* auf die gewünschten Antikörpereigenschaften eingestellt werden, zum Beispiel Bindung unter definierten pH-Werten und Temperaturen. Dabei ist für den Panningprozess in der Regel eine Woche von der ersten Panningrunde bis zum mo-

monoklonalen Screening ausreichend. *In vitro*-Verfahren sind deswegen die bevorzugte Lösung für die Generierung von Antikörpern im Hochdurchsatz [Dübel et al., 2010]. Die limitierenden Faktoren bei allen Methoden zur Antikörpergenerierung sind besonders die Antigenverfügbarkeit und der hohe manuelle Aufwand beim Isolieren monoklonaler Antikörper.

### 5.2 Antigenproduktion

Die Produktion rekombinanter Antigene für die Selektion von Antikörpern ist aufwändig. Auch wenn eine Produktion in prokaryotischen Systemen möglich ist, müssen die Antigene danach zunächst gereinigt werden. Eine besondere Herausforderung bei der Produktion von Antigenen im Hochdurchsatz ist ihre Heterogenität. Während scFvs für die Herstellung einer scFv-Phagenbibliothek stets eine bestimmte Struktur, Faltung und Größe haben, sind Antigene sehr divers, sodass die Generierung einer Antigenbibliothek komplizierter ist.

Auch werden in Prokaryoten wie *E. coli* post-translationale Modifikationen nicht durchgeführt. Es muss deswegen abgeschätzt werden, ob auch eine unnatürliche Konformation für die Selektion des Antikörpers ausreichend ist. Wenn die Antigene nicht in der erforderlichen Qualität und Menge in *E. coli* exprimiert werden können, müssen entweder relevante Domänen identifiziert und kloniert oder das Produktionssystem gewechselt werden.

Die Alternative zu prokaryotischen Expressionssystemen stellen vor allem eukaryotische Zelllinien dar wie menschliche embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*, HEK) oder Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (*chinese hamster ovary cells*, CHO). Diese erhöhen allerdings auch die Anforderungen an Ausstattung, Wissen und die Kosten, da Kultivierung und Produktion höhere Anforderungen an Medienkomposition und Umgebungsparameter erfordern. Vorteile sind die post-translationalen Modifikationen wie die Veränderung der Faltung durch Chaperone,

N-Glykosylierung der Proteine im endoplasmatischen Retikulum, O-Glykosylierung im Golgi-Apparat und Phosphorylierungen durch Proteinkinasen. Ist die korrekte Faltung des Proteins allerdings nicht möglich, wird das Protein durch die zelleigene Qualitätskontrolle an den Lysinen ubiquitinyliert [Hershko & Ciechanover, 1998] und durch das Proteasom abgebaut [Coux et al., 1996].

Ein weiteres Problem bei der Antigenproduktion *in vivo* kann die Toxizität des Antigens darstellen. Neben der Reduktion eines Gesamtproteins auf eine nicht-toxische Domäne besteht die Möglichkeit, auf *in vitro*-Expressionssysteme zurückzugreifen. Eine signifikante Miniaturisierung und Parallelisierung in der Antigenproduktion durch den Einsatz zellfreier Expressionssysteme konnte so bereits bei der Translation von über 13.000 humanen Transkripten gezeigt werden [Goshima et al., 2008]. Auch die chemische Synthese von Peptiden kann zur Produktion *in vitro* eingesetzt werden. Während die Kosten zur Zeit bei ca. 2,50 Euro pro Aminosäure bei Peptiden bis 200 Aminosäuren liegen, wird diese Technologie in Zukunft als Alternative sogar für Proteine im Hochdurchsatz zu moderaten Kosten zur Verfügung stehen.

### 5.3 Einfluss der Antigenimmobilisierung auf das Panning

Einen starken Einfluss auf die Selektion hat die Art der Immobilisierung des Antigens, indem bestimmte Epitope unterschiedlich zugänglich oder überhaupt vorhanden sind. Bei der Immobilisierung von Antigenen werden drei Bindungsarten unterschieden: die physikalische Bindung, die kovalente Bindung und die Bindung über Bioaffinität [Rusmini et al., 2007].

Bei der Immobilisierung durch physikalische Kräfte findet eine unspezifische Adsorption an der Oberfläche statt, sodass die Antigene in unterschiedlichen Orientierungen gebunden und zum Teil denaturiert werden. Zum Beispiel werden bei Polystyroloberflächen Proteine nur aufgrund der hydrophoben Interaktionen an der Platte adsorbiert [Pyun et al., 1997]. In diesem Fall werden Binder gegen diskontinuierli-

che Epitope vermehrt angereichert, da die Antigene nicht mehr in ihrer natürlichen Faltung vorliegen. Auch durch die Wahl des Bindepuffers kann der Grad der Denaturierung beeinflusst werden, sodass die Bindung des Proteins an die Oberfläche entsprechend der Anforderungen geändert werden kann.

Bei der kovalenten Bindung reagieren frei zugängliche funktionelle Gruppen exponiert liegender Aminosäuren mit speziell modifizierten Oberflächen. Es ist eine Vielzahl kovalenter Reaktionsmechanismen beschrieben, mit denen sich die Proteine meist ungerichtet immobilisieren lassen, wie zum Beispiel die Bindung über die Thiolgruppe von Cysteinen [Rusmini et al., 2007] oder über Epoxygruppen [Olle et al., 2005].

Wenn möglichst viele Binder gegen kontinuierliche Epitope angereichert werden sollen, können spezifische Wechselwirkungen biologischer Moleküle ausgenutzt werden, die zu sehr hohen Adsorptionskonstanten führen. Aufgrund der hohen Spezifität erlaubt diese Strategie die Bindung in gezielter Orientierung und in der natürlichen Konformation [Schetters, 1999].

In dieser Arbeit wurden bei der Generierung von Antikörper gegen das Modelantigen BMX zunächst klassische Panningstrategien eingesetzt. Dabei wurden die Antigene auf 96-Well Mikrotiterplatten mit hoher Proteinbindekapazität immobilisiert und aus einer scFv-Phagenbibliothek spezifische Antikörper selektiert. Die Immobilisierung erfolgte entweder über direkte Kopplung an eine Polystyroloberfläche oder durch Einsatz der biotinylierten Antigenvariante auf einer Streptavidinbeschichteten Oberfläche. Es konnte gezeigt werden, dass mit beiden Immobilisierungsmethoden spezifische Binder selektiert werden. Dass einige Binder mehrfach selektiert wurden, kann auf eine gute Produzierbarkeit der Antikörper, eine hohe Affinität zum Epitop oder eine gute Zugänglichkeit des Epitops schließen lassen. Dies ist im Konsens mit zahlreichen Publikationen, die die erfolgreiche Selektion

von Antikörpern mit beiden verwendeten Immobilisierungsmethoden beschreiben [Mersmann et al., 2010, Frenzel et al., 2014].

## 5.4 Einfluss der Antigenmenge auf das Panning

Beim Panning werden die Zielantigene meist auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Möglich ist aber auch die Immobilisierung auf magnetischen Partikeln, in Immunoröhrchen oder das Panning in Lösung. Im durchgeführten Panningverfahren werden große Mengen Antigen (1-10  $\mu\text{g}$ ) zur Immobilisierung eingesetzt. Der Einsatz des Antigens im Überschuss soll dabei Einflüsse von unterschiedlichem Immobilisierungsverhalten minimieren und das Antigen auf einer möglichst großen Fläche präsentieren. Die Immobilisierungsfläche und damit Bindekapazität von Mikrotiterplattenwell und Mikrotiterplattenpin ist mit 93  $\text{mm}^2$  bzw. 95  $\text{mm}^2$  vergleichbar. Mit beiden Methoden konnten spezifische Antikörper generiert werden.

Die Häufigkeit, mit der scFvs aus einer Bibliothek isoliert werden, wird dabei durch mehrere Faktoren beeinflusst. So führt eine gute Produzierbarkeit der scFv-pIII-Fusion und geringe Toxizität für die *E. coli*-Zellen zu einer verstärkten Anreicherung des scFv-Phagen in den Selektionsrunden. Auch eine hohe Affinität des scFvs zum Zielantigen erhöht die Wahrscheinlichkeit der Selektion, besonders in der zweiten und dritten Runde durch das monovalente Display der scFvs auf Phagen. Im Gegensatz dazu spielen bei der ersten Panningrunde die Aviditätseffekte eine stärkere Rolle, da bis zu fünf scFvs auf einem Phagen präsentiert werden können. Ein weiterer Effekt, der die Identifikation eines Binders beeinflusst, ist die Produzierbarkeit des scFvs als lösliches Protein, das im Screening-ELISA eingesetzt wird. So wurde bereits beschrieben, dass Lambda-Klone bei der Produktion in *E. coli* besser exprimiert werden als Kappa-Klone und letztere deswegen seltener selektiert werden [Kloset et al., 2005].

Ausschlaggebend für die Nutzung der Pin-Mikrotiterplatte ist aber die Inkubationsmöglichkeit von 96 verschiedenen Antigenen in einem Ansatz. Dafür werden die Pins in eine gemeinsame Inkubationsschale getaucht, in der sich die scFv-Phagenbibliothek befindet. Dies führt nicht nur zu einem geringeren Verbrauch an scFv-Phagenbibliothek, sondern kann auch zu einer besseren Selektion von Bindern führen. Bei 96 verschiedenen Antigenen wird die Bibliothek um das 96-fache im Vergleich zum einzelnen Well einer Mikrotiterplatte abgereichert. Dies beruht auf der parallelen Inkubation der scFv-Phagenbibliothek mit allen Antigenen, sodass die jeweils für ein Antigen spezifischen scFv-Phagen nicht mehr als wenig oder unspezifische Binder für andere Antigene zur Verfügung stehen. Zudem ist die Mikrofluidik in einem großen Volumen besser als in dem kleinen Volumen eines Wells. Durch beide angeführten Parameter können so die unspezifischen Reaktionen und Kreuzreaktivitäten reduziert werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass aus der scFv-Phagenbibliothek gegen die Modellantigene spezifische Antikörper selektiert werden können, wurde die Minimierung der zum Panning benötigten Antigenmenge analysiert. Dies wurde zunächst in dem erprobten System der Mikrotiterplatte durchgeführt, indem mit dem manuellen Microarray-Spotter unterschiedlich viele Spots in ein Well gedruckt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass für das Modellantigen eine Anreicherung spezifischer scFv-Phagen bis zu einer Spotzahl von 8 möglich ist, wohingegen weniger Spots zu keinen Bindern führten. Dies verdeutlicht den Grenzbereich bei der Nutzung von Wells im Mikrotiterplattenformat. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde der Transfer auf Epoxysilan-beschichtete Objektträger in Form von Protein-Microarrays getestet. Diese Oberfläche wurde gewählt, da sie das Antigen kovalent durch eine Epoxybindung immobilisiert und bereits erfolgreich für Kreuzreaktivitätstests mit BMX und CHIN eingesetzt wurde (persönliche Kommunikation Christoph Schröder, DKFZ Heidelberg).



Auch in den Experimenten zur Antigenimmobilisierung für ein Panning konnte die Bindung nachgewiesen werden. Dazu wurde das immobilisierte Antigen mit spezifischen Primärantikörpern und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern inkubiert und im Microarray-Reader detektiert. Bei den Experimenten mit scFv-Phagen wurde allerdings deutlich, dass unspezifische Bindungen an die Glasoberfläche auch durch verschiedene Blockingreagenzien nicht ausreichend reduziert wurden. Es zeigte sich, dass sowohl beim Drucken auf den Epoxysilan-beschichteten Objektträgern als auch beim flächigen Immobilisieren mit großen Mengen des Antigens keine spezifischen Binder selektiert werden konnten. Dies führt zu dem Schluss, dass Epoxysilan-beschichtete Microarrays mit den getesteten Blockingreagenzien Milchpulver und Ethanolamin nicht im Panning eingesetzt werden können.

Als Alternativen bieten sich Glasträger mit anderen modifizierten Oberflächen an, deren Absättigung effizienter durchgeführt werden kann und so das unspezifische Binden von scFv-Antikörpern verhindert. Bereits erfolgreich in der Immobilisierung eingesetzte Glasträger sind zahlreich publiziert. Für die Immobilisierung mit zufälliger Orientierung bieten sich Aldehydoberflächen [Kusnezow et al., 2003], Nitrozellulose oder poly-L-Lysin [Angenendt et al., 2002] an. Soll dagegen die Orientierung des immobilisierten Proteins gerichtet sein, können zum Beispiel auch Nickel [Zhu et al., 2000] oder Streptavidin-beschichtete Glasträger [Lesaicherre et al., 2002] eingesetzt werden. Dass in der Literatur bisher keine Experimente von Protein-Microarrays in der Kombination mit Phagen zu finden sind, kann ein Hinweis auf die Komplexität dieses Themas sein, da Protein-Microarrays in vielen anderen Bereichen bereits erfolgreich angewendet werden.

### 5.5 Charakterisierung von Antikörpern

Die im Panning auf Mikrotiterplatten und Pin-Mikrotiterplatten generierten scFv-Binder wurden für weitere Analysen in das bivalente IgG-ähnliche Format eines scFv-Fc-Antikörpers überführt. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Spezifität der ge-

nerierten Binder. Neben dem Bindungsverhalten auf rekombinantem Antigen in Immunfärbung und ELISA gilt der Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen besondere Beachtung. So muss für den Einsatz der Antikörper auf oberflächenpräsentierenden *E. coli*-Zellen sichergestellt sein, dass keine Kreuzreaktivität mit oder unspezifische Bindung an zelleigenen Proteinen auftritt. Häufig ist die Ursache bei unspezifischer Bindung eine Di- oder Multimerisierung der scFv-Fc-Antikörper, was durch Größenausschlusschromatographie analysiert wurde. Die starke Wechselwirkung des scFv-Fc-Antikörpers AKS50-D9 mit *E. coli*-Proteinen ist dabei aber wahrscheinlich nicht auf dessen vergleichsweise schwache Bildung von Dimeren zurückzuführen, sondern auf die schwache Affinität zum Antigen. Dies wird auch durch die Ergebnisse des Titrations-ELISAs gestützt, in denen das Monomer gegenüber dem Gemisch deutlich an Affinität verliert. Von 14 Bindern waren letztlich 11 für die Arbeit mit oberflächenpräsentierenden *E. coli*-Zellen geeignet. Um die Selektion von Bindern ohne Wechselwirkungen mit einem bestimmten *E. coli*-Stamm zu forcieren, kann auch eine Präadsorption der scFv-Phagenbibliothek und der amplifizierten scFv-Phagen nach jeder Panningrunde durchgeführt werden. Auf diese Weise erfolgt eine sukzessive Abreicherung der unerwünschten Phagen.

### 5.6 Oberflächenpräsentation von Antigenen auf *E. coli*

Während das Phagendisplay für die Generierung von Antikörpern seit langem etabliert ist, werden die dabei benötigten Antigene zumeist rekombinant in *E. coli* hergestellt und über Tags gereinigt. Dabei bieten sich auch hier das Display auf Phagen, Ribosomen- [Hanes & Plückthun, 1997], mRNA- [Seelig, 2011], Hefe- [Cho et al., 2009] oder Prokaryoten [Rutherford & Mourez, 2006] an. So wurde das Display von Peptiden bereits auf mehreren Strukturen auf der Außenseite von *E. coli* gezeigt, zum Beispiel auf dem F-Pilus [Rondot et al., 1998], auf Fimbrien [Pallesen et al., 1995], sowie mithilfe des AIDA-Autodisplay-Systems [Maurer et al., 1997] und anderer Außenmembranproteine [Patel et al., 2001].

## 5 Diskussion

Der Vorteil aller Arten von Oberflächenpräsentation ist die Kopplung von Genotyp und Phänotyp, die die Analyse der spezifischen Wechselwirkungen zwischen Antigenen und Antikörper *in vivo* und auch *in vitro* ermöglicht. Aufgrund der Robustheit und Einfachheit von *E. coli*-Kultivierungen, sowie vielversprechenden Ergebnissen mit einer Vielzahl von Proteinen, wurde das Oberflächendisplay auf *E. coli*-Zellen für die Generierung im Hochdurchsatz gewählt.

Hierfür wurde das Plasmid pOmpU3 konstruiert, das für ein artifizielles Fusionsprotein kodiert - bestehend aus einem Signalpeptid, dem Zielantigen, Linkerregionen und dem  $\beta$ -Fass, das die äußere Membran der Zelle durchspannt. Die Oberflächenexpression wurde mit einem Proteaseverdau und anschließender Auftrennung der Außenmembranproteine mittels SDS-PAGE nachgewiesen und auch für fünf weiteren Testantigene gezeigt werden.

Limitierungen des Oberflächendisplays auf *E. coli*-Zellen stellen dabei das bereits beschriebene Fehlen post-translationaler Modifikationen und die begrenzte Antigengröße dar. Um Antigene für das Panning im Hochdurchsatzverfahren zur Verfügung zu stellen, ist diese Methode jedoch durchaus geeignet, da es nicht notwendig ist, komplette Proteine einzusetzen, sondern auch eine Kombination mehrerer Domänen möglich ist. So kann das Plasmid pOmpU3 zum Oberflächendisplay um eine Gateway-kompatible Gensequenz erweitert für die Generierung einer Antigenbibliothek werden, um cDNA zum Beispiel aus der hORFeome-Bibliothek im Hochdurchsatz zu klonieren.

Die in der hORFeome-Bank hinterlegten cDNA-Sequenzen basieren auf Sequenzen der *Mammalian Gene Collection* [Gerhard et al., 2004]. Die cDNA-Sequenzen dieser Datenbank wurden rechnergestützt ausgewertet und die *open reading frames* (ORFs) einzelner Gene identifiziert. Dabei wurden Isoformen und Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, *single nucleotide polymorphism*) als einzelne unterschiedli-

che Klone berücksichtigt [Lamesch et al., 2007]. Zusätzlich zu den DNA-Sequenzen wurden auch die Proteinsequenzen in der Datenbank hinterlegt, sodass eine Identifizierung relevanter Domänen leicht möglich ist. In Zeiten kostengünstiger DNA-Sequenzierung stehen viele weitere ORF-Bibliotheken verschiedener Organismen zur Verfügung, deren Einsatz im Panning vorstellbar ist. Die cDNA-Sequenzen liegen häufig in Gateway-kompatiblen Vektoren vor und können auf diese Weise schnell und effizient in den Oberflächendisplay-Vektor pOmpU3 kloniert werden.

### 5.7 Alternative Panningstrategien mit oberflächenpräsentierenden Zellen

Für das Panning mit oberflächenpräsentierenden *E. coli*-Zellen als Antigenträger bieten sich besonders zwei Optionen: entweder werden die Zellen direkt in Mikrotiterplatten immobilisiert [Petermann et al., 2010] oder ein zellbasiertes Panning in Lösung [Giordano et al., 2001] durchgeführt. Bei der direkten Immobilisierung der Zellen an Mikrotiterplatten entstehen durch die große Oberfläche der Zellen eine starke Bindung. Hauptbestandteil der äußeren Zellmembran von *E. coli*-Zellen sind Lipopolysaccharide (LPS). Das LPS-Molekül besteht aus drei Teilen: dem lipophilen Lipid A, der Kernregion (Oligosaccharid) und der O-spezifischen Seitenkette (Polysaccharid). Aus diesem Grund sollten Mikrotiterplatten verwendet werden, die sowohl lipophile wie auch hydrophile Strukturen binden können [Petermann et al., 2010]. Die Konformation des Antigens wird hierbei nicht verändert wie bei der kovalenten Bindung. Ein Vorteil ist dabei die hohe Antigenmenge auf der Zelloberfläche, die bis zu 5 % der Gesamtzellproteine ausmachen kann [Maurer et al., 1997]. Somit können mehr als  $10^5$  Antigenmoleküle pro Zelle für das Panning zur Verfügung stehen, ohne dass die Viabilität oder Integrität beeinflusst werden [Jose et al., 2005].

## 5 Diskussion

Beim zellbasierten Panning in Lösung werden die Zellen nach Inkubation mit der scFv-Phagenbibliothek durch eine organische Phase zentrifugiert. Unspezifische scFv-Phagen, die zumeist durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Zellen interagieren, werden dabei in der organischen Phase abgereichert. Das Zellpellet wird mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und zu infizierbaren *E. coli*-Zellen gegeben, um die scFv-Phagen für die nächste Panningrunde zu amplifizieren. Der manuelle Aufwand hindert dabei den Einsatz dieser Methode im Hochdurchsatz.

In beiden Fällen muss eine mehrmalige Präadsorption der scFv-Phagenbibliothek auf den eingesetzten *E. coli*-Stämmen durchgeführt werden, um unspezifische Bindungen an zelleigene Proteine und damit Kreuzreaktionen zu reduzieren. Der Vorteil beider Methoden ist, dass keine aufwendige Reinigung der Antigene notwendig ist. Des weiteren kann die Expression des Antigens auf der Zelloberfläche durch zytometrische Analysen schnell und *in time* quantifiziert werden. Der limitierende Faktor bei beiden Methoden ist allerdings das Anziehen von Einzelkolonien für die Analyse im Screening-ELISA. Nach der zweiten bzw. dritten Panningrunde sind spezifisch bindende scFv-Phagen zwar angereichert, trotzdem ist das manuelle Auswählen und Anziehen von Einzelkolonien nötig, um monospezifische Analysen durchführen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem die Hypothese widerlegt werden, dass *E. coli*-Zellen, die das Antigen an der Oberfläche präsentieren, durch eine spezifischen scFv-Phagen-Bindung auch ohne das Vorhandensein eines F-Pilus infiziert werden. Statt einer Infektion durch örtliche Nähe konnte im Gegenteil gezeigt werden, dass bei Inkubation mit spezifischen scFv-Phagen die unspezifische Infektionsrate abnimmt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die spezifischen scFv-Phagen an dem Antigen an der Oberfläche gebunden bleiben und nicht für die Infektion zur Verfügung stehen. Trotzdem ist diese Erkenntnis von großer Bedeutung, da auf der nachgewiesenen Antigen-Antikörper-Bindung zwischen *E. coli*-Zelle und

scFv-Phage neue Strategien entwickelt werden können.

Als neue Panningstrategie soll aufgrund dieser Limitierung mithilfe des entwickelten Oberflächendisplays und den bereits erfolgreich eingesetzten scFv-Phagenbibliotheken eine neue Idee verfolgt werden. Dabei soll nicht gegen ein gezielt gewähltes Antigen selektiert werden, sondern beide Bibliotheken in Lösung interagieren. In der Literatur wurden bereits viele Ansätze zur Erforschung von Protein-Protein-Wechselwirkungen mittels Phagen- und Bakteriendisplay erwähnt. Wegweisend für den im Folgenden diskutierten Ansatz ist die Publikation von [Benhar et al., 2000], in der gezeigt wurde, dass scFv-Phagen spezifisch an Oberflächen-präsentierte Antigene auf *E. coli*-Zellen gebunden haben. Es handelt sich bei den Zellen um Träger des F-Episoms, das aber durch Kultivierung bei niedriger Temperatur nicht zur Piliusbildung führt. Erst nach Inkubation mit den scFv-Phagen wurde die Temperatur der Kultur erhöht, um die Infektion zu ermöglichen. Dabei wurde beobachtet, dass die jeweilige Zellen zwar von einem scFv-Phagen infiziert wurden, nicht aber von jenem, der spezifisch an die Oberfläche gebunden war.

Ausgehend von diesem Ergebnis ist ein neuer Ansatz denkbar, der auf dem gleichen Prinzip beruht, aber vor Erhöhung der Temperatur zur Bildung der Pili eine Vereinzelung der Zellen mit den daran gebundenen scFv-Phagen auf Agarplatten vorsieht. Auf diese Weise soll verhindert werden, dass eine Zelle von einem anderen als dem daran gebundenen scFv-Phagen infiziert wird. Eine Voraussetzung für die Umsetzung ist die Konstruktion von Vektoren mit kompatiblen Replikationsursprüngen [Nordström & Austin, 1989], um die gleichzeitige Erhaltung der genetischen Information von scFv und Antigen innerhalb einer Zelle sicherzustellen. Ist es möglich, diese Methode zu realisieren, könnte sich die Proteomforschung einen entscheidenden Schritt weiterentwickeln und einen wichtigen Beitrag zu Grundlagenforschung, Diagnostik und Therapie leisten.

## 6 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden grundlegende Erkenntnisse zur Antigenimmobilisierung auf Microarrays und zur Generierung oberflächenpräsentierenden *E. coli*-Zellen erlangt. Diese können in Zukunft für die Entwicklung weiterer Antikörperselektionsstrategien eingesetzt werden. Vielversprechende Möglichkeiten für die Generierung von Antikörpern im Hochdurchsatz sind dabei die Miniaturisierung durch den Einsatz von minimalen Antigenmengen in Mikrotiterplatten, zellbasiertes Panning und im besonderen die Selektion von Antikörpern gegen ganze Antigenbibliotheken. Diese neue Antikörperselektionsstrategie vermeidet die im Panning auf immobilisiertem Antigen auftretenden Limitierungen und kombiniert die Vorteile von Phagen- und Bakteriendisplay.

# Literaturverzeichnis

- [Angenendt et al., 2002] Angenendt, P., Glökler, J., Murphy, D., Lehrach, H., & Cahill, D. J. (2002). Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Analytical biochemistry*, 309(2), 253–60.
- [Barbas et al., 2001] Barbas, C. F., Burton, D. R., & Silverman, G. J. (2001). *Phage Display: A Laboratory Manual*. CSHL Press.
- [Barbas et al., 1991] Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A., & Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 7978–82.
- [Benhar et al., 2000] Benhar, I., Azriel, R., Nahary, L., Shaky, S., Berdichevsky, Y., Tamarkin, A., & Wels, W. (2000). Highly efficient selection of phage antibodies mediated by display of antigen as Lpp-OmpA’ fusions on live bacteria. *Journal of molecular biology*, 301(4), 893–904.
- [Bird et al., 1988] Bird, R., Hardman, K., Jacobson, J., Johnson, S., Kaufman, B., Lee, S., Lee, T., Pope, S., Riordan, G., & Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242(4877), 423–426.
- [Breitling & Dübel, 1997] Breitling, F. & Dübel, S. (1997). *Rekombinante Antikörper*. Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- [Cenni et al., 2012] Cenni, B., Gutmann, S., & Gottar-Guillier, M. (2012). BMX



- and its role in inflammation, cardiovascular disease, and cancer. *International reviews of immunology*, 31(2), 166–73.
- [Chang, 1983] Chang, T.-W. (1983). Binding of cells to matrixes of distinct antibodies coated on solid surface. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 217–223.
- [Chaudhary et al., 1989] Chaudhary, V. K., Queen, C., Junghans, R. P., Waldmann, T. A., FitzGerald, D. J., & Pastan, I. (1989). A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature*, 339(6223), 394–7.
- [Cho et al., 2009] Cho, Y. K., Chen, I., Wei, X., Li, L., & Shusta, E. V. (2009). A yeast display immunoprecipitation method for efficient isolation and characterization of antigens. *Journal of immunological methods*, 341(1-2), 117–26.
- [Clackson et al., 1991] Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., & Winter, G. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 352(6336), 624–8.
- [Colcher et al., 1998] Colcher, D., Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B. J., Choudhury, A., & Batra, S. K. (1998). Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. *The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)*, 42(4), 225–41.
- [Corpet, 1988] Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research*, 16(22), 10881–90.
- [Coux et al., 1996] Coux, O., Tanaka, K., & Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual review of biochemistry*, 65, 801–47.
- [de Haard et al., 1999] de Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, a., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruïne, a. P., Arends, J. W., & Hoogenboom, H. R.

- (1999). A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *The Journal of biological chemistry*, 274(26), 18218–30.
- [de Wildt et al., 2000] de Wildt, R. M., Mundy, C. R., Gorick, B. D., & Tomlinson, I. M. (2000). Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nature biotechnology*, 18(9), 989–94.
- [Deantonio et al., 2014] Deantonio, C., Cotella, D., Macor, P., Santoro, C., & Sblattero, D. (2014). Phage display technology for human monoclonal antibodies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1060, 277–95.
- [Diehnelt et al., 2010] Diehnelt, C. W., Shah, M., Gupta, N., Belcher, P. E., Greving, M. P., Stafford, P., & Johnston, S. A. (2010). Discovery of high-affinity protein binding ligands–backwards. *PloS one*, 5(5), e10728.
- [Donatin & Drancourt, 2012] Donatin, E. & Drancourt, M. (2012). DNA microarrays for the diagnosis of infectious diseases. *Médecine et maladies infectieuses*, 42(10), 453–9.
- [Dübel, 2007] Dübel, S. (2007). Recombinant therapeutic antibodies. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(4), 723–9.
- [Dübel et al., 2004] Dübel, S., Rohrbach, P., & Schmiedl, A. (2004). Rekombinante Antikörper: Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und Autoimmunerkrankungen? *Biologie in unserer Zeit*, 34(6), 372–379.
- [Dübel et al., 2010] Dübel, S., Stoevesandt, O., Taussig, M. J., & Hust, M. (2010). Generating recombinant antibodies to the complete human proteome. *Trends in biotechnology*, 28(7), 333–9.
- [Dueñas et al., 1994] Dueñas, M., Vázquez, J., Ayala, M., Söderlind, E., Ohlin, M., Pérez, L., Borrebaeck, C. A., & Gavilondo, J. V. (1994). Intra- and extracellular expression of an scFv antibody fragment in *E. coli*: effect of bacterial strains and

- pathway engineering using GroES/L chaperonins. *BioTechniques*, 16(3), 476–7, 480–3.
- [Durocher et al., 2002] Durocher, Y., Perret, S., & Kamen, A. (2002). High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic acids research*, 30(2), E9.
- [Europäische Kommission, 2010] Europäische Kommission (2010). EU Binder Projects.
- [Frenzel et al., 2014] Frenzel, A., Kügler, J., Wilke, S., Schirrmann, T., & Hust, M. (2014). Construction of human antibody gene libraries and selection of antibodies by phage display. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1060, 215–43.
- [Freund et al., 1993] Freund, C., Ross, A., Guth, B., Plückthun, A., & Holak, T. A. (1993). Characterization of the linker peptide of the single-chain Fv fragment of an antibody by NMR spectroscopy. *FEBS letters*, 320(2), 97–100.
- [Gerhard et al., 2004] Gerhard, D. S., Wagner, L., Feingold, E. A., Shenmen, C. M., Grouse, L. H., Schuler, G., Klein, S. L., Old, S., Rasooly, R., Good, P., Guyer, M., Peck, A. M., Derge, J. G., Lipman, D., Collins, F. S., Jang, W., Sherry, S., Feolo, M., Misquitta, L., Lee, E., Rotmistrovsky, K., Greenhut, S. F., Schaefer, C. F., Buetow, K., Bonner, T. I., Haussler, D., Kent, J., Kiekhaus, M., Furey, T., Brent, M., Prange, C., Schreiber, K., Shapiro, N., Bhat, N. K., Hopkins, R. F., Hsie, F., Driscoll, T., Soares, M. B., Casavant, T. L., Scheetz, T. E., Brownstein, M. J., Usdin, T. B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Piao, Y., Dudekula, D. B., Ko, M. S. H., Kawakami, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Gruber, C. E., Smith, M. R., Simmons, B., Moore, T., Waterman, R., Johnson, S. L., Ruan, Y., Wei, C. L., Mathavan, S., Gunaratne, P. H., Wu, J., Garcia, A. M., Hulyk, S. W., Fuh, E., Yuan, Y., Sneed, A., Kowis, C., Hodgson, A., Muzny, D. M., McPherson, J., Gibbs, R. A., Fahey, J., Helton, E., Kettelman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madari, A., Young, A. C., Wetherby, K. D., Granite, S. J., Kwong, P. N., Brinkley,

- C. P., Pearson, R. L., Bouffard, G. G., Blakesly, R. W., Green, E. D., Dickson, M. C., Rodriguez, A. C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R. M., Butterfield, Y. S. N., Griffith, M., Griffith, O. L., Krzywinski, M. I., Liao, N., Morin, R., Morrin, R., Palmquist, D., Petrescu, A. S., Skalska, U., Smailus, D. E., Stott, J. M., Schnerch, A., Schein, J. E., Jones, S. J. M., Holt, R. A., Baross, A., Marra, M. A., Clifton, S., Makowski, K. A., Bosak, S., & Malek, J. (2004). The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome research*, 14(10B), 2121–7.
- [Giordano et al., 2001] Giordano, R. J., Cardó-Vila, M., Lahdenranta, J., Pasqualini, R., & Arap, W. (2001). Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nature medicine*, 7(11), 1249–53.
- [Goshima et al., 2008] Goshima, N., Kawamura, Y., Fukumoto, A., Miura, A., Honma, R., Satoh, R., & Wakamatsu, A. (2008). Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro expressed proteome. *Nature Methods*, 5(12), 1011–1017.
- [Haab et al., 2001] Haab, B., Dunham, M., & Brown, P. (2001). Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biology*, 2(2), research0004.1–research0004.13.
- [Hanes & Plückthun, 1997] Hanes, J. & Plückthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 4937–42.
- [Hantke, 1981] Hantke, K. (1981). Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Molecular & general genetics : MGG*, 182(2), 288–92.
- [Harrison et al., 2002] Harrison, P. M., Kumar, A., Lang, N., Snyder, M., & Gerstein, M. (2002). A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic acids research*, 30(5), 1083–90.

- [Hayashi et al., 1994] Hayashi, N., Welschof, M., Zewe, M., Braunagel, M., Dübel, S., Breitling, F., & Little, M. (1994). Simultaneous mutagenesis of antibody CDR regions by overlap extension and PCR. *BioTechniques*, 17(2), 310, 312, 314–5.
- [He et al., 2008] He, M., Stoevesandt, O., Palmer, E., & Khan, F. (2008). Printing protein arrays from DNA arrays. *Nature methods*, 5(2), 175–177.
- [He & Taussig, 2001] He, M. & Taussig, M. J. (2001). Single step generation of protein arrays from DNA by cell-free expression and in situ immobilisation (PISA method). *Nucleic acids research*, 29(15), E73–3.
- [Hershko & Ciechanover, 1998] Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, 67, 425–79.
- [Hust et al., 2011] Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rülker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M. I., Schütte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., & Dübel, S. (2011). A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *Journal of biotechnology*, 152(4), 159–70.
- [Huston et al., 1993] Huston, J. S., McCartney, J., Tai, M. S., Mottola-Hartshorn, C., Jin, D., Warren, F., Keck, P., & Oppermann, H. (1993). Medical applications of single-chain antibodies. *International reviews of immunology*, 10(2-3), 195–217.
- [Hwang & Foote, 2005] Hwang, W. Y. K. & Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods (San Diego, Calif.)*, 36(1), 3–10.
- [Jäger et al., 2013] Jäger, V., Büssow, K., Wagner, A., Weber, S., Hust, M., Frenzel, A., & Schirrmann, T. (2013). High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC biotechnology*, 13(1), 52.
- [Jakobovits, 1995] Jakobovits, A. (1995). Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Current opinion in biotechnology*, 6(5), 561–6.

- [Jose et al., 2005] Jose, J., Betscheider, D., & Zangen, D. (2005). Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. *Analytical biochemistry*, 346(2), 258–67.
- [Karlsson et al., 2003] Karlsson, F., Borrebaeck, C. A. K., & Nilsson, N. (2003). The Mechanism of Bacterial Infection by Filamentous Phages Involves Molecular Interactions between TolA and Phage Protein 3 Domains. *Journal of bacteriology*, 185(8), 2628–2634.
- [Kipriyanov, 2001] Kipriyanov, S. M. (2001). High-level periplasmic expression and purification of scFvs. In P. M. O’Brien & R. Aitken (Eds.), *Antibody Phage Display*, volume 178 (pp. 333–341). New Jersey: Humana Press.
- [Kloset et al., 2005] Kloset, G., Lobersli, A., Kavlie, A., Stacy, J., & Borgen, T. (2005). Construction, evaluation and refinement of a large human antibody phage library based on the IgD and IgM variable gene repertoire. *Journal of immunological methods*, 299(1-2), 47–62.
- [Koga et al., 2014] Koga, Y., Yamazaki, N., Takizawa, S., Kawauchi, J., Nomura, O., Yamamoto, S., Saito, N., Kakugawa, Y., Otake, Y., Matsumoto, M., & Matsumura, Y. (2014). Gene expression analysis using a highly sensitive DNA microarray for colorectal cancer screening. *Anticancer research*, 34(1), 169–76.
- [Köhler & Milstein, 1975] Köhler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497.
- [Kusnezow et al., 2003] Kusnezow, W., Jacob, A., Walijew, A., Diehl, F., & Hoheisel, J. D. (2003). Antibody microarrays: an evaluation of production parameters. *Proteomics*, 3(3), 254–64.
- [Lamesch et al., 2007] Lamesch, P., Li, N., Milstein, S., Fan, C., Hao, T., Szabo, G., Hu, Z., Venkatesan, K., Bethel, G., Martin, P., Rogers, J., Lawlor, S., McLaren,

- S., Dricot, A., Borick, H., Cusick, M. E., Vandenhaute, J., Dunham, I., Hill, D. E., & Vidal, M. (2007). hORFeome v3.1: a resource of human open reading frames representing over 10,000 human genes. *Genomics*, 89(3), 307–15.
- [Lesaicherre et al., 2002] Lesaicherre, M.-L., Lue, R. Y. P., Chen, G. Y. J., Zhu, Q., & Yao, S. Q. (2002). Intein-mediated biotinylation of proteins and its application in a protein microarray. *Journal of the American Chemical Society*, 124(30), 8768–9.
- [Levy et al., 2007] Levy, S., Sutton, G., Ng, P. C., Feuk, L., Halpern, A. L., Walenz, B. P., Axelrod, N., Huang, J., Kirkness, E. F., Denisov, G., Lin, Y., MacDonald, J. R., Pang, A. W. C., Shago, M., Stockwell, T. B., Tsiamouri, A., Bafna, V., Bansal, V., Kravitz, S. A., Busam, D. A., Beeson, K. Y., McIntosh, T. C., Remington, K. A., Abril, J. F., Gill, J., Borman, J., Rogers, Y.-H., Frazier, M. E., Scherer, S. W., Strausberg, R. L., & Venter, J. C. (2007). The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS biology*, 5(10), e254.
- [Loignon et al., 2008] Loignon, M., Perret, S., Kelly, J., Boulais, D., Cass, B., Bisson, L., Afkhamizarreh, F., & Durocher, Y. (2008). Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells. *BMC biotechnology*, 8, 65.
- [Marvin, 1998] Marvin, D. (1998). Filamentous phage structure, infection and assembly. *Current opinion in structural biology*, 8(2), 150–158.
- [Maurer et al., 1997] Maurer, J., Jose, J., & Meyer, T. F. (1997). Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 179(3), 794–804.
- [McCafferty et al., 1990] McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301), 552–4.

- [Mersmann et al., 2010] Mersmann, M., Meier, D., Mersmann, J., Helmsing, S., Nilsson, P., Gräslund, S., Colwill, K., Hust, M., & Dübel, S. (2010). Towards proteome scale antibody selections using phage display. *New biotechnology*, 27(2), 118–28.
- [Miersch & LaBaer, 2011] Miersch, S. & LaBaer, J. (2011). Nucleic Acid programmable protein arrays: versatile tools for array-based functional protein studies. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]*, Chapter 27, Unit27.2.
- [Miethe et al., 2013] Miethe, S., Meyer, T., Wöhl-Bruhn, S., Frenzel, A., Schirrmann, T., Dübel, S., & Hust, M. (2013). Production of single chain fragment variable (scFv) antibodies in Escherichia coli using the LEX (TM) bioreactor. *Journal of biotechnology*, 163(2), 105–11.
- [Moser et al., 2004] Moser, K. L., Gaffney, P. M., Grandits, M. E., Emamian, E. S., Machado, D. B., Baechler, E. C., Rhodus, N. L., & Behrens, T. W. (2004). The use of microarrays to study autoimmunity. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*, 9(1), 18–22.
- [Murphy et al., 2009] Murphy, K. M., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- [Nordström & Austin, 1989] Nordström, K. & Austin, S. J. (1989). Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annual review of genetics*, 23, 37–69.
- [Olle et al., 2005] Olle, E. W., Messamore, J., Deogracias, M. P., McClintock, S. D., Anderson, T. D., & Johnson, K. J. (2005). Comparison of antibody array substrates and the use of glycerol to normalize spot morphology. *Experimental and molecular pathology*, 79(3), 206–9.



- [Osbourn et al., 2005] Osbourn, J., Groves, M., & Vaughan, T. (2005). From rodent reagents to human therapeutics using antibody guided selection. *Methods (San Diego, Calif.)*, 36(1), 61–8.
- [Owens & Young, 1994] Owens, R. J. & Young, R. J. (1994). The genetic engineering of monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods*, 168(2), 149–65.
- [Pallesen et al., 1995] Pallesen, L., Poulsen, L. K., Christiansen, G., & Klemm, P. (1995). Chimeric FimH adhesin of type 1 fimbriae: a bacterial surface display system for heterologous sequences. *Microbiology (Reading, England)*, 141 ( Pt 1, 2839–48.
- [Parmley & Smith, 1988] Parmley, S. F. & Smith, G. P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, 73(2), 305–18.
- [Patel et al., 2001] Patel, D., Vitovski, S., Senior, H. J., Edge, M. D., Hockney, R. C., Dempsey, M. J., & Sayers, J. R. (2001). Continuous affinity-based selection: rapid screening and simultaneous amplification of bacterial surface-display libraries. *The Biochemical journal*, 357(Pt 3), 779–85.
- [Petermann et al., 2010] Petermann, K., Vordenbäumen, S., Pyun, J.-C., Braukmann, A., Bleck, E., Schneider, M., & Jose, J. (2010). Autodisplay of 60-kDa Ro/SS-A antigen and development of a surface display enzyme-linked immunosorbent assay for systemic lupus erythematosus patient sera screening. *Analytical biochemistry*, 407(1), 72–8.
- [Pini et al., 1998] Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P., & Neri, D. (1998). Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *The Journal of biological chemistry*, 273(34), 21769–76.
- [Plückthun, 1991] Plückthun, A. (1991). Antibody engineering: advances from the

- use of Escherichia coli expression systems. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 9(6), 545–51.
- [Predki et al., 2005] Predki, P. F., Mattoon, D., Bangham, R., Schweitzer, B., & Michaud, G. (2005). Protein microarrays: a new tool for profiling antibody cross-reactivity. *Human antibodies*, 14(1-2), 7–15.
- [Pyun et al., 1997] Pyun, J. C., Cheong, M. Y., Park, S. H., Kim, H. Y., & Park, J. S. (1997). Modification of short peptides using epsilon-aminocaproic acid for improved coating efficiency in indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *Journal of immunological methods*, 208(2), 141–9.
- [Retter et al., 2005] Retter, I., Althaus, H. H., Münch, R., & Müller, W. (2005). VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic acids research*, 33(Database issue), D671–4.
- [Rondot et al., 1998] Rondot, S., Anthony, K. G., Dübel, S., Ida, N., Wiemann, S., Beyreuther, K., Frost, L. S., Little, M., & Breitling, F. (1998). Epitopes fused to F-pilin are incorporated into functional recombinant pili. *Journal of molecular biology*, 279(3), 589–603.
- [Rondot et al., 2001] Rondot, S., Koch, J., Breitling, F., & Dübel, S. (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature biotechnology*, 19(1), 75–8.
- [Rusmini et al., 2007] Rusmini, F., Zhong, Z., & Feijen, J. (2007). Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*, 8(6), 1775–89.
- [Russel et al., 1988] Russel, M., Whirlow, H., Sun, T. P., & Webster, R. E. (1988). Low-frequency infection of F- bacteria by transducing particles of filamentous bacteriophages. *Journal of bacteriology*, 170(11), 5312–5316.
- [Rutherford & Mourez, 2006] Rutherford, N. & Mourez, M. (2006). Surface display

- of proteins by gram-negative bacterial autotransporters. *Microbial cell factories*, 5(1), 22.
- [Sblattero & Bradbury, 2000] Sblattero, D. & Bradbury, a. (2000). Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nature biotechnology*, 18(1), 75–80.
- [Schetters, 1999] Schetters, H. (1999). Avidin and streptavidin in clinical diagnostics. *Biomolecular Engineering*, 16(1-4), 73–78.
- [Schirrmann et al., 2008] Schirrmann, T., Al-Halabi, L., Dübel, S., & Hust, M. (2008). Production systems for recombinant antibodies. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 4576–94.
- [Schott, 2009] Schott, N. A. (2009). NEXTERION Epoxysilane-Coated Microarray Glass Slides: Protein Application.
- [Seelig, 2011] Seelig, B. (2011). mRNA display for the selection and evolution of enzymes from in vitro-translated protein libraries. *Nature protocols*, 6(4), 540–52.
- [Sharkey & Goldenberg, 2006] Sharkey, R. M. & Goldenberg, D. M. (2006). Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA: a cancer journal for clinicians*, 56(4), 226–43.
- [Skerra & Plückthun, 1988] Skerra, A. & Plückthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4855), 1038–41.
- [Smith, 1985] Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4705), 1315–7.
- [Teicher & Chari, 2011] Teicher, B. A. & Chari, R. V. J. (2011). Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(20), 6389–97.

- [Thie et al., 2011] Thie, H., Toleikis, L., Li, J., von Wasielewski, R., Bastert, G., Schirrmann, T., Esteves, I. T., Behrens, C. K., Fournes, B., Fournier, N., de Romeuf, C., Hust, M., & Dübel, S. (2011). Rise and fall of an anti-MUC1 specific antibody. *PloS one*, 6(1), e15921.
- [Vieira & Messing, 1987] Vieira, J. & Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in enzymology*, 153, 3–11.
- [von Behring & Kitasato, 1890] von Behring, E. & Kitasato, S. (1890). Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei thieren. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 16, 1113–1114.
- [Wheeler et al., 2008] Wheeler, D. A., Srinivasan, M., Egholm, M., Shen, Y., Chen, L., McGuire, A., He, W., Chen, Y.-J., Makhijani, V., Roth, G. T., Gomes, X., Tartaro, K., Niazi, F., Turcotte, C. L., Irzyk, G. P., Lupski, J. R., Chinault, C., Song, X.-z., Liu, Y., Yuan, Y., Nazareth, L., Qin, X., Muzny, D. M., Margulies, M., Weinstock, G. M., Gibbs, R. A., & Rothberg, J. M. (2008). The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*, 452(7189), 872–6.
- [Winter & Milstein, 1991] Winter, G. & Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature*, 349(6307), 293–9.
- [Yang et al., 2008] Yang, Z., Liu, Q., Wang, Q., & Zhang, Y. (2008). Novel bacterial surface display systems based on outer membrane anchoring elements from the marine bacterium *Vibrio anguillarum*. *Applied and environmental microbiology*, 74(14), 4359–65.
- [Yokota et al., 1992] Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M., & Schlom, J. (1992). Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer research*, 52(12), 3402–8.
- [Zhu et al., 2000] Zhu, H., Klemic, J. F., Chang, S., Bertone, P., Casamayor, A., Klemic, K. G., Smith, D., Gerstein, M., Reed, M. A., & Snyder, M. (2000). Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nature genetics*, 26(3), 283–9.

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe, für die wissenschaftliche Betreuung und viele hilfreiche Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. André Fleißner für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima, den freundschaftlichen Umgang miteinander sowie für die gegenseitige Unterstützung. Besonders danke ich Dr. André Frenzel und Doris Meier für viele praktische Tipps, Diskussionen über Experimente, das Leben und die Welt, für tatkräftige Unterstützung im Labor und das Vertrauen in meine Fähigkeiten.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für den liebevollen Rückhalt, das Vertrauen und vor allem für die Zuversicht, dass ich meinen Weg gehen werde.